

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Langová

Vliv časného stresu na neuroendokrinní regulaci, chování a imunitu

Effect of early stress on neuroendocrine regulation, behavior and immunity

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Martin Vodička

Praha, 2016

**Poděkování:**

Děkuji především svému školiteli Mgr. Martinu Vodičkovi za ochotu, trpělivost a množství cenných rad poskytnutých pro úspěšné vypracování mé bakalářské práce. Dále děkuji kolektivu Oddělení funkce epitelu Fgu AV ČR v.v.i. pod vedením Prof. RNDr. Jiřího Páchy, DrSc za každou odpověď na mnou položenou otázku a možnost být přítomna řadě experimentů.

Děkuji také své rodině za podporu poskytovanou po celou dobu studia.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla a citovala všechny literární i informační zdroje. Zároveň prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

**V Praze, 8. 8. 2016**

**Podpis: .....**

## **Abstrakt**

V souvislosti s charakterem časného stresu se mohou v dospělosti lišit hladiny výchozích hormonů hypothalamo-hypofyzárně-adrenální (HPA) osy, kortikoliberinu (CRH) a argininu-vazopresinu. Tento efekt může být ještě zesílen vystavením jedince akutnímu stresu. Příčinou vyšší hladiny může být podle některých autorů nižší míra metylace v promotorech genů těchto hormonů. Častým důsledkem vysoké hladiny výchozích hormonů je vysoká hladina kortikosteronu. K vyšší koncentraci volného kortikosteronu v krvi může přispívat i nižší hladina transkortinu, která je pozorovaná u dospělých jedinců po prenatální malnutrici. Lokálně ve tkáních je hladina kortikosteronu regulována 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázami dvou typů. Hyperreaktivita HPA osy může být příčinou úzkostného chování. K regulaci úzkostného chování dochází vazbou CRH na jeho receptory. Myši s vyřazeným genem pro receptor prvního typu (CRHR1) vykazují obecně méně úzkostné chování. Naopak vazba CRH na receptor druhého typu (CRHR2) může podle některých autorů úzkostné chování tlumit. U prenatálně stresovaných samců byla pozorována vyšší exprese CRHR1, prenatálně stresované samice vykazují redukovanou expresi CRHR2. Dospělá zvířata, která byla v rané fázi života vystavena stresu, také vykazují depresi podobné chování. To může souviset s přítomností některých prozánětlivých cytokinů a jejich receptorů v mozku. Vyšší hladiny prozánětlivých cytokinů jsou u časně stresovaných jedinců pozorovány i na periférii. Naopak hladiny protizánětlivých cytokinů jsou redukovány nebo odpovídají kontrolním hladinám. U časně stresovaných zvířat je také pozorováno abnormální procentuální zastoupení a vyšší reaktivita buněk imunitního systému.

## **Klíčová slova**

stres, neuroendokrinní regulace, hypothalamo-hypofyzárně-adrenální osa, kortikoliberin, kortikosteron, chování, imunita

## **Abstract**

Levels of initial hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginin-vasopressin, can be altered in adulthood with a context of early-life stress. The effect can be stronger after an acute stress. Some authors suggest that higher levels can be caused by hypomethylation of that genes promoters. High level of default hormones often results in high concentration of corticosterone. Higher concentration of corticosterone in blood can also be supported by a lower level of transcortine, which has been observed in adulthood after a prenatal malnutrition. Locally in tissues is the concentration of corticosterone regulated by 2 types of  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Hyperreactivity of HPA axis can cause an anxiety-like behavior. Anxiety-like behavior is regulated by binding CRH to its receptors. Mice with knocked out gene of the first type receptor (CRHR1) shows generally less anxiety-like behavior. Conversely, some author say that binding CRH to its second type receptor (CRHR2) can inhibit an anxiety-like behavior. Prenatally stressed males show increased expression of CRHR1, prenatally stressed females show reduced expression of CRHR2. Early-life stressed animals also shows a depression-like behavior. It can be related to the presence of some pro-inflammatory cytokines and its receptors in brain. Higher levels of pro-inflammatory cytokines are observed also on the periphery. Conversely, levels of anti-inflammatory cytokines are reduced or coincide with control levels. Early-life stressed animals were also observed to have an abnormal percentage and higher reactivity of immune cells.

## **Keywords**

stress, neuroendocrine regulation, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, corticotropin releasing hormone, corticosterone, behavior, immunity

## Seznam zkratek

5-HT – serotonin (5-hydroxytryptamin)

5-HTT – 5-hydroxytryptaminový transporter

5-HT<sub>1</sub> – 5-hydroxytryptaminový receptor prvního typu

5-HT<sub>2</sub> – 5-hydroxytryptaminový receptor druhého typu

11β-HSD1 - 11β-

hydroxysteroiddehydrogenáza prvního typu

11β-HSD2 - 11β-

hydroxysteroiddehydrogenáza druhého typu druhého typu

AMP – adenosinmonofosfát (adenosine monophosphate)

ACTH – kortikotropin (adrenocorticotropic hormone)

AVP – arginin-vazopresin

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate)

CeA – centrální jádro amygdaly (central nucleus of the amygdala)

CNS – centrální nervová soustava

CREB – protein vázající se na cAMP odpovídající element (cAMP response element-binding protein)

CRH – kortikoliberin (corticotropin-releasing hormone)

CRH-BP – protein vázající kortikoliberin (corticotropin-releasing hormone-binding protein)

CRHR1 – kortikoliberinový receptor prvního typu (corticotropin-releasing hormone receptor 1)

CRHR2 – kortikoliberinový receptor druhého typu (corticotropin-releasing hormone receptor 2)

CTRC2 – transkripční koaktivátor druhého typu

regulovaný CREB (CREB regulated transcription coactivator 2)

DA – dopamin

Epi – adrenalin (epinephrin)

EPM – vyvýšené křížové bludiště (elevated plus maze)

FST – test nuceného plavání (forced swim test)

GC – glukokortikoid(y)

GR – glukokortikoidní receptor

GRE – na GC odpovídající element (glucocorticoid-response element)

HPA – hypothalamo-hypofyzárně -adrenální osa

IL-1β – interleukin 1β

IL-2 – interleukin 2

IL-5 – inteleukin 5

IL-6 – inteleukin 6

IL-10 – interleukin 10

IL-12 – interleukin 12

INFγ – interferon γ

LC – locus coeruleus

MCR-2 – melanokortinový receptor (melanocortine receptor)

MR – mineralokortikoidní receptor

NE – noradrenalin (norepinephrin)

NGF – nervový růstový faktor (nerve growth factor)

NO – oxid dusnatý

OT – oxytocin

PNCs – parvocelulární neuroendokrinní buňky (Parvocellular neuroendocrine cells)

POMC – proopiomelanokortin (proopiomelanocortine)

PVN – paraventriculární jádro (nucleus paraventricularis)

SA – sympatoadrenální osa

SON – supraoptické jádro (nucleus supraopticus)

Tc – cytotoxický T-lymfocyt

Th1 – pomocný T-lymfocyt prvního typu (T helper cell 1)

Th2 – pomocný T-lymfocyt druhého typu (T helper cell 2)

TNF $\alpha$  – faktor nádorové nekrózy  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ )

V1b – vazopresinový receptor 1B

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Cíle práce.....	1
2	Neuroendokrinní odpověď na stres .....	3
2.1	Sympatoadrenální osa .....	3
2.2	Hypothalamohypofyzárně adrenální osa a její regulace.....	4
2.2.1	Lokální metabolismus glukokortikoidů.....	6
3	Časný stres .....	8
3.1	Kritické období pro vývoj mozku potkana a myši .....	9
3.2	Intenzita stresu a její důsledky .....	9
3.3	Vliv mateřského stresu na vývoj potomka .....	10
4	Vliv časného stresu na HPA osu .....	12
4.1	Vliv prenatálního stresu na bazální aktivitu HPA osy dospělých potkanů a myši .....	12
4.2	Vliv prenatálního stresu v kombinaci se stresem v dospělosti na HPA osu .....	13
4.3	Vliv postnatálního stresu na bazální aktivitu HPA osy dospělých potkanů a myši .....	14
4.4	Vliv postnatálního stresu v kombinaci se stresem v dospělosti na HPA osu .....	15
5	Vliv časného stresu na chování v dospělosti .....	17
5.1	Úzkostné chování .....	18
5.1.1	Úzkostné chování a časný stres .....	18
5.1.2	Vliv časného stresu na centrální regulaci spjatou s úzkostným chováním.....	19
5.2	Depresi podobné chování .....	21
6	Vliv časného stresu na imunitu .....	23
6.1	Cytokiny .....	23
6.1.1	Vliv časného stresu na prozánětlivé cytokiny .....	24
6.1.2	Vliv časného stresu na protizánětlivé cytokiny .....	25
6.2	Nespecifická složka imunity .....	25
6.2.1	Vliv časného stresu na nespecifickou složku imunity .....	25
6.3	Specifická složka imunity .....	26
6.3.1	Vliv časného stresu na specifickou složku imunity.....	26

7	Závěr .....	28
8	Literatura .....	29



## 1 Úvod

Každý organismus je od počátku nucen se vyrovnávat se změnami vnějšího prostředí. Přizpůsobování se vnějším změnám je přitom nezbytné ke správné funkci organismu, k zachování stálosti vnitřního prostředí, homeostázy. Pro každý parametr v těle je tak nastavena ideální hodnota, tzv. setpoint. Zachovávání homeostázy znamená udržování konkrétních hodnot na setpointu. V situacích, které homeostázu ohrožují, je často pro udržení konkrétních hodnot na setpointu zapotřebí obrovské množství energie a rozmanitých mechanismů. Vystavení organismu v časném vývoji faktoru ohrožujícímu homeostázu, stresoru, může být příčinou abnormálních setpointů pro hormony drah stresové reakce, jejich receptory, ale například i pro procentuální zastoupení buněk imunitního systému při stresové reakci v dospělosti.

V roce 1936 se Hans Selye po pokusech s potkany poprvé zmiňuje o souboru reakcí organismu jako odpověď na poškození či ohrožení, objevujících se ve třech fázích. K první, poplachové, fázi dochází po 6 – 48 hodinách od vystavení organismu stresovému podnětu a Selye ji popsal zmenšením thymu, sleziny, lymfatických žláz a jater, úbytkem tukové tkáně a vznikem edému a dalšími příznaky. Druhá, adaptační, fáze nastupuje po 48 hodinách a projevuje se zvětšením nadledvin, které získávají lipoidní granula, mizením edému, výskytem bazofilů v hypofýze, atrofií gonád, zastavením laktace. Při pokračování mírného stresu se zvířata na konci druhé fáze adaptují a může dojít téměř k obnovení jejich původního stavu. Selye ale vyzníval ještě třetí fázi. Zvíře, které je vystavováno stresu po delší odmlce, 1 – 3 měsících při ní ztrácí rezistenci a vykazuje opět příznaky fáze první, které pokračují až do vyčerpání (Selye 1936).

Dnes jsou známy nejen mechanismy morfologické ale i fyziologické a z části i molekulární. V současnosti je stres chápán jako momentální či předpokládané narušení homeostázy organismu či přepokládané ohrožení, které by mohlo vyvést organismus z rovnováhy, přičemž některé nevratné změny v homeostázi mohou vést až k ukončení nezbytných životních pochodů a následné smrti. Ulrich-Lai & Herman definují stres jako „skutečné či očekávané narušení homeostázy nebo očekávané ohrožení zdraví“ (Ulrich-Lai & Herman 2009). Průběh stresové reakce se liší mezi pohlavími a je ovlivněn genetickým základem, přičemž s rozdílnou intenzitou reagují i kmeny téhož druhu (Savignac et al. 2011).

### 1.1 Cíle práce

Bakalářská práce je zaměřená na srovnání studií zabývajících se stresem v perinatálním období a jeho vlivem na stav organismu v dospělosti. V úvodu definovaný pojem stres je v následující kapitole rozšířen o popis mechanismu. Další kapitoly jsou věnovány vlivu mechanismů stresové reakce na neuroendokrinní regulaci, chování a imunitu. Ty jsou spolu úzce propojeny a svým působením se vzájemně ovlivňují. Jsou známy korelace mezi psychickými a imunitními chorobami a prodělanými traumaty či nízkým socioekonomickým statutem v rané fázi života (Miller et al. 2009; Carr et al. 2013;

George et al. 2010). Prokázána je rovněž souvislost mezi přítomností prozánětlivých cytokinů v mozku a depresivním chováním (Diz-Chaves et al. 2013).

Světová zdravotnická organizace v roce 1946 definovala zdraví jako „stav kompletní duševní, fyzické a sociální pohody a ne pouze nepřítomnost nemoci či slabost“ (<http://www.who.int/suggestions/faq/en/>), časný stres je tak jistě přínosným tématem studia i z klinického hlediska.

## 2 Neuroendokrinní odpověď na stres

Organismus reaguje na ohrožení homeostázy vyvolané zátěžovou situací dvěma neuroendokrinními cestami, tzv. osami. První z nich se nazývá osa sympatoadrenální (SA), druhá hypothalamohypofyzárně adrenální (HPA). Cílem obou os je tak zvýšení pozornosti jedince, transport imunitních buněk, zvýšení krevního tlaku, příprava jednoduchých energeticky využitelných substrátů. Dochází k aktivaci katabolických procesů ve svalových a tukových buňkách. Výsledkem katabolismu je rozklad triacylglycerolu na mastné kyseliny a proteinů na aminokyseliny, glykogenolýza. Mastné kyseliny jsou oxidovány a spolu s glycerolem a aminokyselinami mohou být transportovány do jater. V jaterních buňkách, hepatocytech, dochází k proteosyntéze. Při stresové reakci je ve všech ostatních buňkách proteosyntéza omezená. Příčinou proteosyntézy v játrech je potřeba enzymů nezbytných pro anaboličké procesy vedoucí ke glukoneogenezi a glykogenezi. Nově syntetizované molekuly glukózy jsou tak využity jako stavební kameny glykogenu nebo jsou exocytovány a transportovány krví do tkání (Kim & Kim 1975; McEwen 2005).

### 2.1 Sympatoadrenální osa

Sympatoadrenální osa zajišťuje rychlou stresovou odpověď, při které dochází k výlevu již připravených váčků s katecholaminy z buněk dřeně nadledvin. Signalizace začíná aktivací sympatických nervů vycházejících z míchy v oblasti mezi 10. hrudním a 4. bederním obratlem. Pregangliové neurony autonomního vegetativního systému předávají v gangliích signál v podobě acetylcholinu neuronům postgangliovým. Ty pak inervují cílové orgány. V případě SA je signál pregangliovými neurony veden přímo k chromafinním buňkám dřeně nadledvin. Chromafinní buňky zastávají funkci přeměněných postgangliových neuronů. Jejich výstup v podobě katecholaminů adrenalinu (epinefrinu, Epi), noradrenalinu (norepinefrinu, NE) a malého množství dopaminu (DA) je ale směřován do krve a do tkání se tedy dostává endokrinně. Epi a NE se váží na adrenergní receptory 5 typů,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , rovněž dopamin má k dispozici také 5 typů dopaminergních receptorů (Nicholls et al. 2001; Kuhar et al. 1999).

Výsledky pokusu, při němž byly matky v době gestace opakovaně po dobu 30 nebo 240 minut denně umisťovány do těsného prostoru, vlivu hypokinetického stresu pregnantní matky na hladiny katecholaminů dospělých samčích potomků nenasvědčují. Rovněž po prenatalní malnutrici se bazální hladina katecholaminů u potkaních samců v dospělosti signifikantně neliší od samců nestresovaných (Hashimoto et al. 2001; Lesage et al. 2002).

Reakce dospělých potomků na vystavení hypokinetickému stresovému podnětu v dospělosti ale ovlivněna prenatalním stresem být může. Vystavení dospělého prenatalně nestresovaného jedince hypokinetickému stresu po dobu 60 minut způsobuje zvýšení hladin Epi a NA. Obdobně se hladiny zvyšují u jedinců, jejichž matky byly opakovaně vystavovány během gestace krátkodobému, 30 minut trvajícimu, stresu. Naproti tomu u dlouhodobě prenatalně stresovaných potkanů, jejichž matky byly vystavovány hypokinetickému stresu po dobu 240 minut denně, vystavením hypokinetickému stresu v

dospělosti k signifikantnímu zvýšení hladiny katecholaminů nedochází (Hashimoto et al. 2001). Prenatální malnutrice patrně vliv na hladiny NE dospělého jedince při vystavení hypokinetickému stresu po dobu 30 minut nemá. Hladina Epi je ale u prenatálně nestresované skupiny výrazně vyšší oproti skupině prenatálně stresované (Lesage et al. 2002).

## **2.2 Hypothalamohypofyzárně adrenální osa a její regulace**

Druhá z os, hypothalamohypofyzárně adrenální, má sice pomalejší nástup, nicméně její účinky jsou déletrvající než účinky osy SA (Ulrich-Lai & Herman 2009).

Odpověď HPA osy je zahájena ve formě kortikoliberinu (hormon uvolňující kortikotropin, corticotropine releasing hormone, CRH), v paraventriculárním jádře hypothalamu (nucleus paraventricularis, PVN), kam přicházejí informace o stavu organismu z různých oblastí mozku, jakými je prefrontální kůra, mozkový kmen či hippokampus. Jedním ze signálů regulujících tvorbu CRH je zpětnovazebná inhibice výstupními hormony glukokortikoidy (GC), významná především v hippokampu (Ralaivirinana et al. 2010). Syntéza CRH v amygdale je naopak GC indukována, jeho přítomnost zde řídí odpověď na naučené podněty či stresory. V mozkovém kmeni pak CRH řídí odpověď na nepodmíněné podněty (McNally & Akil 2002). Přítomnost GC v hippokampu mláďat a jejich navázání na glukokortikoidní receptor rovněž vede k vyšší expresi nervového růstového faktoru (NGF), který je odpovědný za růst a diferenciaci neuronů (Hayes et al. 1996).

Dalším ze signálů pro tvorbu CRH je přítomnost NE v PVN. Signál je veden z mozkového kmene, struktury locus coeruleus (LC) a dalších adrenergických oblastí (Smith & Vale 2006).

Regulační funkci v syntéze hypothalamického CRH má i oxytocin (OT). Vazbou na své receptory omezuje přenos transkripčního koaktivátoru druhého typu regulovaného CREB (CREB regulated transcription coactivator 2, CRT2) do jádra. Ten je jedním z kofaktorů exprese regulované proteiny vázajícími se na cAMP odpovídající element (cAMP response element-binding protein, CREB). Výsledkem je inhibice exprese CRH (Jurek et al. 2015)

CRH je uvolněn z PVN do portálního oběhu v eminentia mediana, kterým se dostává do adenohipofýzy. V adenohipofýze je vázán na svůj membránový receptor. Jsou známy 2 typy membránových receptorů pro CRH, CRHR1 a CRHR2, přičemž pro adenohipofýzu je charakteristická přítomnost CRHR1. Přes signál vedený G-proteiny je v buňkách pars distalis v adenohipofýze zahájena exprese pro-opiomelanokortinu (POMC) (Rivier & Spiess 1983), prekursoru adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a dalších látek, jakými jsou např.  $\beta$ -endorfin (Roberts et al. 1979) a  $\beta$ -lipotropin (Notake et al. 1983). Aktivace receptorů CRHR1 a CRHR2 přitom může být znemožněna vazbou proteinu vázajícího kortikoliberin (CRH-BP) k CRH (Stinnett et al. 2015).

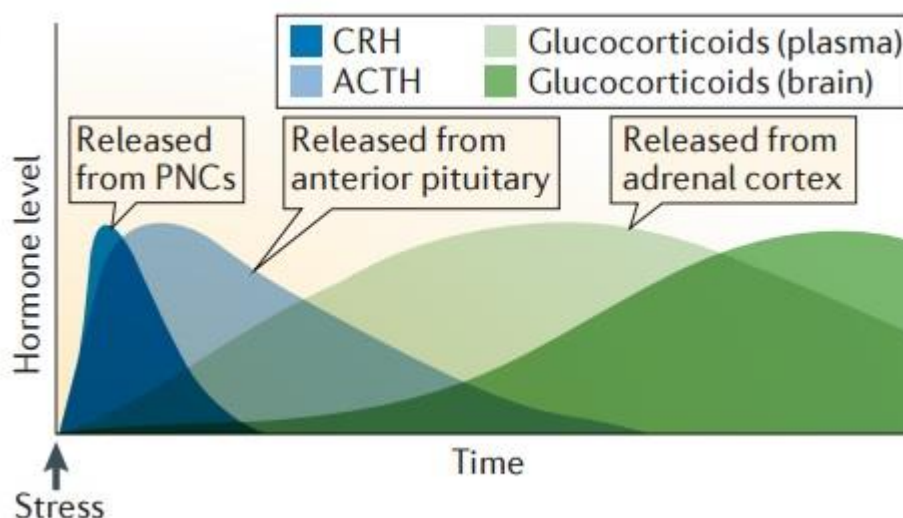
Kromě CRH jsou dalšími hormony syntetizovanými v hypothalamu a ovlivňujícími sekreci ACTH arginin-vazopresin (AVP) a OT. Oba jsou syntetizovány hojně v magnocelulárních neuronech supraoptického jádra (SON). Odtud putují přímo do neurohypofýzy a dále pokračují do krevního řečiště. V souvislosti s regulací HPA osy jsou AVP a OT syntetizovány také v parvocelulárních neuronech PVN

a portálním oběhem dopraveny k adenohypofýze. Oba se váží na V1b receptor spřažený s G-proteiny (Nakamura et al. 2016). Vazbou na V1b spouští kaskádu vedoucí k otevření  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů, signálu pro expresi POMC. Z něj je sestřižen ACTH a uvolněn do krve (Murgatroyd et al. 2015).

Uvolněný ACTH je transportován k adrenálnímu kortexu, kde je v oblasti zona fasciculata a reticularis vázán na melanokortinový receptor druhého typu (MCR-2), lokalizovaný v plazmatické membráně. ACTH vazbou na MCR-2 zahajuje signalizaci trimerních G-proteinů.  $\alpha$  podjednotka G-proteinu aktivuje adenylcyklastu. Vzniklý cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) pak vazbou na regulační podjednotky protein kinasy A uvolňuje její katalytické podjednotky. Ty fosforylují CREB protein. Vazbou CREB proteinu ke CRE místu je aktivována transkripce enzymů nezbytných pro tvorbu GC.

Hlavním lidským GC, který má vliv na stresovou odpověď je kortizol, u potkanů a myší kortikosteron. GC jsou z nadledvin transportovány k cílovým tkáním buď volně či vázané na transkortin (corticosteroid-binding globulin, CBG). CBG snižuje míru hydrofobicity GC, čímž usnadňuje transport GC krví a zároveň brání prostupu GC přes plazmatickou membránu. Tím je značně omezen i průchod GC přes hematoencefalickou bariéru.

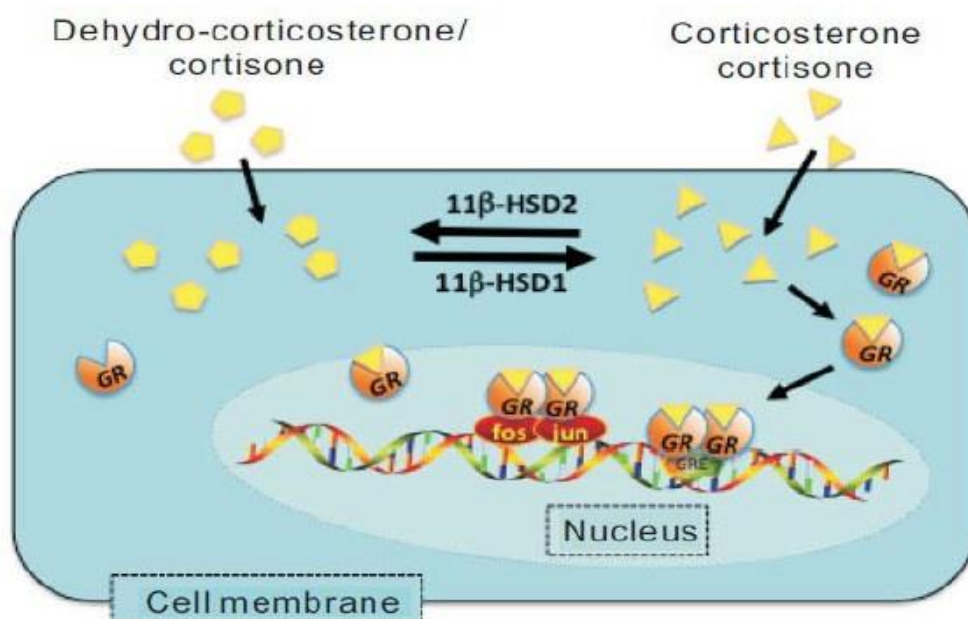
V cílových tkáních se GC váží na glukokortikoidní (GR) a mineralokortikoidní (MR) receptory přičemž k MR se váží s větší afinitou. Při nízké koncentraci se ve strukturách obsahujících oba typy receptorů v přibližně podobném množství, například většina struktur hippocampu, váží GC spíše na MR. GR jsou obsazeny až při vysokých hladinách GC. Chronicky aktivovaný MR spouští signalizační kaskádu vedoucí k syntéze oxidu dusnatého (NO). Tvorba NO tlumí expresi GR, čímž narušuje zpětnovazebnou inhibici HPA osy. Chronicky aktivovaná HPA osa může vyústit v depresi podobném chování. Naproti tomu hladina MR v hypothalamu je nízká a k narušení zpětnovazebné inhibice nedochází (Zhu et al. 2014). Oba jaderné receptory jsou rozmístěny po celém organismu, v mozku pak hojně ve strukturách spjatých s řízením emoční či stresové odpovědi, tedy nejen v hypothalamu a hypofýze, ale právě i v hippocampu, amygdale a prefrontální kůře.



Obrázek 1: Obrázek ilustruje výlev hormonů HPA osy a jejich zpětnovazebou inhibici. Uvolnění CRH ze shluku parvocelulárních neuroendokrinních buněk (PNCs) vede k výlevu hypofyzárního ACTH aktivujícího sekreci GC, které pronikají přes hematoencefalickou bariéru. Vazbou k MR a GR GC inhibují sekreci CRH a ACTH. Převzato z *Bains et al. 2015*

### 2.2.1 Lokální metabolismus glukokortikoidů

Lokální regulace koncentrace kortikosteronu a kortizolu je zajištěna přítomností 2 izoforem 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázy (11 $\beta$ -HSD1, 11 $\beta$ -HSD2). 11 $\beta$ -HSD1 redukuje 11-dehydrokortikosteron na kortikosteron a kortizon na kortizol, čímž zvyšuje lokální koncentraci biologicky aktivního GC. 11 $\beta$ -HSD1 je v hojném množství přítomna v buňkách tukové tkáně, jater a CNS. Tuková tkáň produkuje cytokiny, signální molekuly spjaté s imunitním systémem, které zde mají aktivační účinky na expresi 11 $\beta$ -HSD1 (Tomlinson et al. 2001). V reakci na stres není exprese 11 $\beta$ -HSD1 přímo ovlivněna v páteřních strukturách HPA osy, v limbickém systému ano (Vodička et al. 2014), je ale třeba zahrnout genetické předpoklady. Kmen potkanů Fisher 344 vykazuje po expozici stresovému podnětu (kombinace nuceného plavání, vyvýšené plochy a hypokinetického stresu) vyšší expresi 11 $\beta$ -HSD1 v centrálním jádře amygdaly (CeA), oblasti CA1 a CA2 hippocampu, kmen Lewis v prefrontální kůře. Zvýšená exprese právě ve strukturách limbického systému může být důsledkem tendence organismu zesílit zpětnou inhibici HPA osy (Ergang et al. 2015). V játrech a dalších tkáních, nalezneme 11 $\beta$ -HSD2, která oxiduje kortikosteron a kortizol, a tak snižuje lokální koncentraci aktivního hormonu. V souvislosti se stresem během gestace je důležitá přítomnost 11 $\beta$ -HSD2 v placentě. Jejím úlohou zde je chránit plod před vystavením přílišnému množství mateřských GC. Ne vždy jsou však jedinci, ať už plody či matky, schopni tento enzym exprimovat či je mateřský stres příliš závažný a dlouhotrvající. Mateřské GC pak nejsou inaktivovány dostatečnou rychlostí a pronikají k plodu. Zde se s vysokou afinitou váží na své receptory. Mohou způsobit nevratné změny projevující se i v dospělosti (Holmes et al. 2006; Murphy et al. 2002).



Obrázek 2: Aktivace a inaktivace glukokortikoidů izotypy 11 $\beta$ -HSD. Aktivní GC po vazbě na receptory pronikají do jádra, kde regulují transkripci vazbou na elementy odpovídající na glukokortikoidy (GRE) a další transkripční faktory. Převzato z Zhou *et al.* 2013

### 3 Časný stres

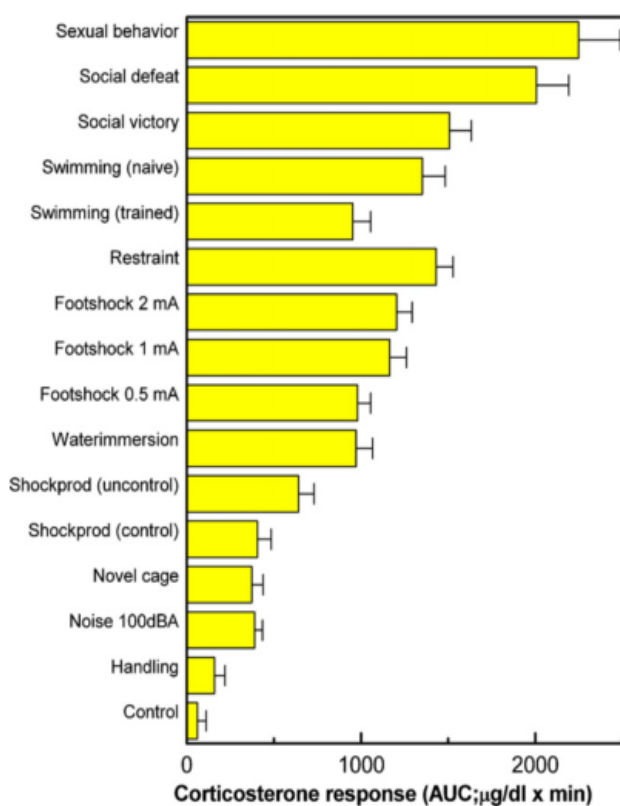
Odpovědi organismu na vystavení stresovým situacím mohou být různé v závislosti na charakteru, závažnosti i době trvání vystavení stresoru. Ulrich-Lai & Herman rozdělují stresory na fyzické a nefyzické („psychogenní“) lišící se reakcí, kterou v organismu vyvolávají. Na fyzický stresor, jakým je ztráta krve, infekce či bolest, reaguje organismus okamžitou přímou odpovědí danou reflexními mechanismy. Odpověď na stresor nefyzický, který je rozpoznán předchozí zkušeností či vrozeně, je pak řízena předním mozkem (Ulrich-Lai & Herman 2009). Bowers rozděljuje stresory na fyzické a psychologické. Fyzický stresor demonstruje na příkladu nízké teploty či nedostatečné potravy, jako příklad psychického stresoru uvádí uvěznění zvířete či predátorovu pachovou stopu (Bowers et al. 2007).

Typy stresu se mohou vzájemně prolínat, fyzická a psychická složka kombinovat. Samotná přítomnost pyrogenu či suboptimální teplota představuje fyzický stres, nicméně organismus si může být vědom ohrožení života a stres se pak zároveň stává i psychickým. V nádobě s vodou (forced swim test, FST) na zvíře působí také obě dvě složky. Psychickou složku představuje strach z utopení se a snaha o záchranu vlastního života. V reakci na ohrožení jedinec plave a postupné vyčerpávání pak představuje fyzickou složku stresu.

Specifikací stresu naopak získáváme konkrétnější představu o jeho příčině. Psychosociální stres je psychický stres, který souvisí s okolními jedinci. Může být vyvolaný odloučením potomka od matky, tzv. maternální separací. Jinou situací vyvolávající psychosociální stres

představuje přítomnost agresivního jedince v okolí jedince pozorovaného, méně agresivního. Modelová situace, při které je pozorovaný jedinec umístěn do terária jedince agresivního se nazývá resident-intruder test (R-I) (Koolhaas et al. 2013).

V prenatálním období je jedinec nucen vyrovnávat se se změnami hladin mateřských stresových hormonů, různou intenzitou hluku apod. Narození pak představuje významné změny fyziologických funkcí těla a životního prostředí. Mírný stres je podmínkou vývoje organismu a v každodenním životě



Obrázek 3: Změna hladiny stresového hormonu kortikosteronu po vystavení různým podnětům po dobu 15 min. Sexuální chování není považováno za stresor, ačkoli vyvolává u samců potkanů kmene Wistar odpověď nejvyšší. Převzato z Koolhaas 2011



je pro přežití jedince nezbytný. Jeho působení vede k postupné adaptaci na zvyšující se zátěž, která doprovází jedince od prenatalního vývoje po celý zbytek jeho života. Krátkodobá zvýšená hladina stresových hormonů, třeba při sexuálním chování (viz obr. 3), je tedy spíše žádoucí. Naopak příliš intenzivní či dlouhotrvající, chronická, stresová odpověď je patologická a může být příčinou řady chorob.

### **3.1 Kritické období pro vývoj mozku potkana a myši**

Gestace u potkanů trvá 21 – 23 dní. 9. dne prenatalního vývoje začínají migrovat buňky neuroektodermu, aby byla 11. dne dokončena nervová trubice. Prenatální vývoj myši trvá 19 – 21 dní a neurulace probíhá 7. – 10. den. Pro srovnání, u člověka dochází ve druhém týdnu prenatalního vývoje k tvorbě neurální ploténky. Kolem ní se 18. dne tvoří neurální valy, které začínají ke konci 3. týdne fúzovat a 28. dne kompletně uzavírají neurální trubici. Tím je položen základ nervové soustavy. Narušení vývoje v tomto období dává vznik vadám, které mohou být neslučitelné se životem. Od této chvíle až po raně postnatální období vzniká, roste a nejvýznamněji se vyvíjí centrální nervová soustava, přičemž dochází k nevratným změnám, které mají vliv na dospělý fenotyp (Kirsten et al. 2013; Rice & Barone 2000).

Vystavení stresoru v druhé polovině prenatalního vývoje až po raně postnatální, vede ke změnám dospělého organismu v bazálním stavu, citlivosti na stresové podněty a schopnosti se se stresujícími situacemi vypořádat (Andersen 2003; Leonardo & Hen 2008). Za raně postnatální lze považovat období ukončené odstavením potomka, kterým se rozumí proces, jehož výsledkem je nahrazení mateřského mléka stravou konzumovanou dospělými jedinci. Poškození plodu může být např. způsobeno narušením struktury placenty zvýšeným množstvím cytokinů ve fetoplacentální jednotce po aplikaci bakteriálního lipopolysacharidu (LPS). LPS působí v organismu jako pyrogen a jeho přítomnost v perinatálním období nastavuje průběh imunitních reakcí v dospělosti (Kirsten et al. 2013).

### **3.2 Intenzita stresu a její důsledky**

Při maternální separaci, modelové stresové situaci pro matku i potomky, je důležitým parametrem nejen doba, po kterou je matka vzdálena, ale i prostředí, kterému je potomek vystaven. Experimentální situace, při které je mládě od matky separováno v podestýlce se liší svými výsledky od situace, při které je mláděti podestýlka odebrána. Hladina GC v nucleu raphe mozkového kmene moduluje expresi serotoninového membránového transporteru (5-HTT) a serotoninových receptorů prvního a druhého typu (5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>2</sub>) v mozkovém kmeni. 5-HTT a serotoninové receptory regulují vznik úzkostného chování. V případě, že je samec vystaven krátkodobé separaci (15 minut denně) v hníždě, exprese 5-HT<sub>1</sub> v mozkovém kmeni je nižší oproti kontrolám i dlouhodobě (360 minut denně) separovaným a to jak v mládí (3 týdny), tak v dospělosti (10 týdnů). Exprese 5-HT<sub>2</sub> receptorů po krátkodobé maternální separaci je nižší pouze u mladých samců ponechaných v hníždě, v dospělosti se od ostatních skupin, tj. od dlouhodobě separovaných v hníždě či bez hnízda nebo krátkodobě separovaných bez hnízda, neliší. Exprese 5-HTT je naopak nižší pouze u dospělých krátkodobě separovaných samců, kterým byla

ponechána podestýlka. Krátkodobě maternálně separovaní jedinci se mohou více podobat jedincům žijícím ve volné přírodě, neboť matky se při shánění potravy vzdalují od hnízda zcela běžně. Během postnatální periody vykazují obecně dlouhodobě separovaní potkani nižší hmotnost, zatímco po postnatální periodě (od 21. dne) pouze ti, kteří byli separováni bez podestýlky (Oreland et al. 2009).

Naopak stejně intenzivní stresor může u zvířat různého kmene vyvolat odlišné reakce. Samci myši kmene C57BL/6 disponují v dospělosti po 3 hodinách maternální separace denně s časným odstavem (17. den) oproti samcům kmene DBA/2 méně úzkostným, zato však depresi podobnějším chováním (George et al. 2010).

### 3.3 Vliv mateřského stresu na vývoj potomka

Jednu ze změn v chování matky způsobenou chronickým stresem představuje rychlejší nástup agresivního chování matek zahrnujícího útočnost a kousání. Matky hlodavců, které byly stresovány v období gestace, vykazují postupně vzrůstající rozdíly v psychologickém i fyziologickém stavu oproti kontrolám. Chronicky stresované matky reagovaly 9. den stresu s latencí do prvního útoku 17.8 s, zatímco nestresované 30.5 s. S pokračujícím stresem dochází k výraznému poklesu produkce mléka, 16. den stresování činí rozdíl v produkci 40% (Nephew & Bridges 2012). Množství vyprodukovaného mléka přímo souvisí s velikostí potomků, potomci stresovaných matek vykazují postupně klesající rychlost růstu. V průměru jsou 70 dní staří dospělí potkani, jejichž matky byly během gravidity vystaveny psychosociálnímu stresu, o 25 g lehčí než potkani, jejichž matky stresovány nebyly (Nephew & Bridges 2012).

Rozdíly ve velikostech myších samců nejen těsně po narození, ale i v dospělosti, souvisí s expresí placentální 11 $\beta$ -HSD2. Funkce tohoto enzymu spočívá v konverzi biologicky aktivních forem GC na neaktivní. Chronický mateřský stres způsobuje výrazný pokles exprese 11 $\beta$ -HSD2 placentou, plody jsou v takovém případě vystaveny silnějšímu působení mateřských glukokortikoidů (Lesage et al. 2007). Účinky nadměrného působení GC na plod byly prokázány pomocí pokusů s inaktivací genu pro 11 $\beta$ -HSD2. Myší matky homozygotní v inaktivaci genu pro 11 $\beta$ -HSD2 (11 $\beta$ -HSD2(-/-)) produkují menší potomstvo, oproti matkám, které 11 $\beta$ -HSD2 exprimují (+/+ a +/-). Porodní hmotnosti potomků se přitom liší i v závislosti na expresi 11 $\beta$ -HSD2 potomkem. Porodní hmotnost 11 $\beta$ -HSD2(+/+) potomků je nejvyšší, zatímco 11 $\beta$ -HSD2(-/-) nejnižší. Nicméně zatímco -/- potomci +/- matek dorůstají do velikosti srovnatelné s velikostí exprimujících potomků, -/- potomci -/- matek zůstávají v dospělosti o 20 – 25% lehčí (Holmes et al. 2006).

Obecně se u stresovaných matek objevuje vzrůstající péče o sebe sama (self grooming) a klesající péče o potomky (grooming) (Nephew & Bridges 2012). V rozvoji úzkostného chování potomků přitom může být péče matky rozhodující. Potomci myšího kmene BALB/c vykazují v dospělosti úzkostnější chování než myši kmene C57BL/6. Matky kmene C57BL/6 jsou přitom považovány za pozornější vůči svým potomkům oproti matkám kmene BALB/c. Dostatečné vynahrazení mateřské péče potomkům po návratu do hnízda tak může představovat prevenci před rozvojem úzkostného chování. Za vyšší péči

poskytovanou potomkům může být zodpovědná vyšší hladina serotoninu (5-HT) (Savignac et al. 2011). 5-HT přitom může vazbou na 5-HT<sub>7</sub> aktivovat expresi GR v hippocampu. Odpověď na zvýšenou koncentraci GC je pak citlivější a zpětnovazebná inhibice HPA osy rychlejší. Potomci pozornějších matek v dospělosti vykazují méně reaktivní HPA osu danou patrně vyšší expresí GR. Kritické období je přitom nejspíše prvních 10 dní života. Pozornost matek lze zvýšit krátkodobou (15 min) separací (Liu et al. 2010; Laplante et al. 2002).

#### **4 Vliv časného stresu na HPA osu**

Časný stres je patrně důležitým faktorem určujícím reaktivitu HPA osy v dospělosti. Ta je dána mírou exprese pátečních hormonů, jejich receptorů, ale i hormonů podílejících se na její regulaci. Samotná exprese je potom významně ovlivněna epigenetickými modifikacemi.

##### **4.1 Vliv prenatálního stresu na bazální aktivitu HPA osy dospělých potkanů a myší**

Zdá se, že klidová exprese stresových hormonů se v dospělosti odvíjí od povahy prenatálního stresoru. Již u výchozího hormonu HPA osy, CRH, jsou v PVN po vystavení různým druhům stresorů u téhož kmene laboratorních potkanů, kmene Sprague-Dawley, prokázány odlišné výsledky. Lze říci, že bazální exprese CRH v dospělosti ovlivněna prenatálním stresem může být. Míra těchto změn je ale závislá na genetickém pozadí, pohlaví a charakteru stresového podnětu. Potomci obou pohlaví potkanů Sprague-Dawley, jejichž matky byly vystaveny během gestace 2x denně po 30 minut hypokinetickému stresu, v dospělosti vykazují v PVN nižší bazální hladinu mRNA CRH oproti kontrolám jedincům (Xu et al. 2014). Po vystavení matky 10 minutám denně psychosociálnímu stresoru se přitom hladiny mRNA CRH v PVN dospělých potomků ani jednoho pohlaví od hladin kontrolních skupin neliší (Brunton & Russell 2010). Samčí hladina přitom není ovlivněna ani prenatální malnutricí (Lesage et al. 2002). Kombinace stresorů, které je pregnantní samice vystavená, pak u potomků rozdílné odpovědi oproti kontrolám vyvolávat může, výsledek je ale závislý na pohlaví jedince. Zatímco u samců, jejichž matky byly během gestace postupně vystaveny několika různým druhům stresorů, bazální hladina hypothalamického mRNA CRH v dospělosti ovlivněna není, samice vykazují oproti prenatálně nestresovaným kontrolám hladinu vyšší (Zohar & Weinstock 2011).

Kombinace stresorů v prenatálním období patrně také tlumí expresi CRH-BP u obou pohlaví. Nižší hladina CRH-BP může negativně ovlivnit sekreci ACTH. Hladina CRH-BP přitom také dokládá význam aktivity HPA osy ve výsledném chování jedince. Jedinci s deletovaným genem pro CRH-BP vykazují úzkostnější fenotyp (Karolyi et al. 1999; Zohar & Weinstock 2011).

Vystavení matek potkanů Sprague-Dawley 10 minut R-I denně sice patrně nestačí k navýšení klidové hladiny CRH u jejích potomků, nicméně klidová hladina dalšího významného stresového hormonu – AVP je u prenatálně stresovaných samic oproti kontrolním samicím skupině výrazně vyšší. Působení vyšší hladiny AVP může být odpovědné za zvýšené hladiny mRNA POMC i ACTH v hypofýze takto prenatálně stresovaných samic oproti samicím nestresovaným. Stejně tak je oproti kontrolám vyšší i bazální hladina kortikosteronu. Takto stresované samice zároveň v dospělosti vykazují odlišné chování oproti prenatálně nestresovaným samicím i oproti samcům (Brunton & Russell 2010). Mezi pohlavími jsou přitom v expresi hormonů HPA osy rozdíly. Protože vystavení matek 10 minutám psychosociálního stresu denně u samců neovlivňuje bazální expresi CRH ani AVP, není překvapením, že také hladiny POMC, ACTH a kortikosteronu odpovídají hladinám kontrolní skupiny (Brunton & Russell 2010; Diz-Chaves et al. 2013; Hashimoto et al. 2001). Výsledek zároveň poukazuje na význam AVP pro aktivaci HPA osy. Také po prodělání malnutrice v prenatálním období odpovídá samčí koncentrace volného

kortikosteronu koncentraci prenatalně nestresované skupiny. Rozdíl nebyl pozorován, přestože prenatalně stresovaní dospělí samci vykazují nižší koncentraci CBG (Lesage et al. 2002).

Po prenatalní malnutrici je také pozorována zvýšená exprese MR receptoru v CA1 hippocampu, která může působit jako vyrovnávací mechanismus HPA osy po vystavení organismu nadměrnému množství GC (Lesage et al. 2002). Naproti tomu vystavení pregnantní matky 10 minut hypokinetickému stresu denně má na expresi MR v hippocampu dospělých potomků obou pohlaví tlumivý účinek. Dospělé prenatalně stresované samice mají redukovanou rovněž expresi GR. Nedostatečná exprese těchto receptorů a tedy i narušená negativní zpětná vazba způsobuje necitlivost HPA osy a může vést k její hyperreaktivitě (Brunton & Russell 2010).

#### **4.2 Vliv prenatalního stresu v kombinaci se stresem v dospělosti na HPA osu**

Teprve po vystavení dospělého jedince akutnímu stresoru je pozorován účinek nižší hladiny CBG po prenatalní malnutrici na koncentraci volného kortikosteronu. Ta je vyšší po 30 minutách hypokinetického stresu, oproti koncentraci prenatalně nestresovaných samců. Spolu s vysokou hladinou MR tak vysoká hladina kortikosteronu přispívá k rychlejší zpětnovazebné regulaci HPA osy (Lesage et al. 2002). Hladina jiného hormonu podílejícího se na regulaci HPA osy, CRH-BP, je po kombinaci stresorů v prenatalním období a umístění zvířete do vyvýšeného křížového bludiště (popsáno v kapitole 5.1 Úzkostné chování) v dospělosti odlišná v závislosti na pohlaví. Zatímco u samců, kteří byli prenatalně stresováni, vzrůstá více než u samců kontrolních, prenatalně stresované samice vykazují oproti prenatalně nestresovaným přírůstek menší. Prenatálně stresovaní samci tak regulují aktivaci exprese POMC rychleji, prenatalně stresované samice pomaleji než kontrolní skupiny (Zohar & Weinstock 2011).

Ačkoli se bazální hladiny mRNA CRH v závislosti na povaze prenatalního stresoru liší, po vystavení akutnímu stresu v dospělosti je pozorována exprese zvýšená a někdy i prodloužená. Tak je hladina mRNA CRH jedinců obou pohlaví po kombinaci stresorů v prenatalním období zvýšena po umístění do křížového bludiště výrazně více než hladina prenatalně nestresované skupiny. Samičí odpověď je přitom výraznější než samčí (Zohar & Weinstock 2011). Vystavení 2x denně 30 minutám hypokinetického stresoru u potomků obou pohlaví pak způsobuje zvýšenou a prodlouženou expresi CRH oproti kontrolní skupině. Vyšší a prodloužená exprese je podmíněná demethylacemi CpG dinukleotidů v promotoru genu pro CRH (Xu et al. 2014). Metylace CpG v promotoru, které jsou příkladem epigenetických modifikací, představují jeden ze způsobů umlčení exprese genů. Obdobně reagují v dospělosti na fyzický stresor v podobě interleukinu-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) o koncentraci 500 ng/kg a hypokinetický stresor působící 30 minut potomci, jejichž matky byly v době gestace denně vystaveny 10 minutám psychosociálního stresoru. 4 hodiny po aplikaci IL-1 $\beta$  či umístění zvířete do těsného prostoru jsou hladiny mRNA CRH v PVN výrazně zvýšeny, přičemž hladiny kontrolních skupin signifikantně zvýšeny nejsou. Aktivovaná exprese CRH u prenatalně stresované skupiny může být dána také sníženou expresí především MR hippocampu,

kteřá způsobuje utlumení negativní zpětné vazby. Prenatálně stresovaní samci vykazují také zvýšenou hladinu AVP, kontroly ani samice obou skupin přitom nikoli (Brunton & Russell 2010).

V návaznosti na intenzivnější a déletrvající působení CRH a AVP je intenzivnější a prodloužená exprese i dalších hormonů HPA osy, ACTH a GC. Prenatální stres tak patrně způsobuje hyperreaktivitu HPA osy. 30 minut trvající psychosociální stres v dospělosti způsobuje u prenatálně psychosociálně stresovaných samců oproti samcům prenatálně nestresovaným 2,1 násobně vyšší hladinu ACTH a 1,5 násobně vyšší hladinu kortikosteronu. Samičí hladina ACTH je oproti kontrolní skupině vyšší 2,3 násobně, hladina kortikosteronu pak 1,8 násobně (Brunton & Russell 2010). Zvýšená koncentrace GC dospělých prenatálně stresovaných (dlouhodobý denní hypokinetický stres – 240 minut v kuse, 3x 45 minut či 10 minut R-I denně) samců v odpovědi na vystavení 10 $\mu$ g LPS na kg váhy zvířete či 60 minutám hypokinetického stresoru je oproti zvýšené koncentraci prenatálně nestresovaných kontrol prodloužená (Hashimoto et al. 2001; Brunton & Russell 2010; Diz-Chaves et al. 2013).

#### **4.3 Vliv postnatálního stresu na bazální aktivitu HPA osy dospělých potkanů a myší**

Vyrovňovací mechanismus pomocí zvýšené exprese GR a MR je pozorován nejen po prenatálním, ale i po raně postnatálním stresu. Maternální separace trvající 15 minut denně či stres způsobený aktivací imunitního systému 0,05mg LPS na kg váhy, aktivuje expresi těchto receptorů v hippocampu a frontální kůře. Zvýšená exprese pokračuje i v dospělosti (Meaney et al. 1984; Amath et al. 2012). Důležitá je přitom kvalita mateřské péče v raném stadiu života. Dostatečná mateřská péče v prvním týdnu života potkana snižuje míru metylace v promotorech genů GR a jeho transkripčního faktoru NGFI-A. Vlivem chronického časného stresu způsobeného slabší mateřskou péčí však u potkaních samců ke snížení míry metylace v těchto genech nedochází. Exprese je v dospělosti u skupiny s lepší mateřskou péčí vyšší a je tedy i utlumení aktivity HPA osy je rychlejší (Weaver et al. 2004).

Na metylacích v promotoru genu pro CRH se raně postnatální stres také podepisuje. Důsledky metylace se přitom v dospělosti projevují, stejně jako po prenatálním stresu, spíše při odpovědi na akutní stres. Maternální separace 4 hodiny denně v prvních 2 týdnech života se v dospělosti u samců odráží pouze nesignifikantně vyšší bazální hladinou primárního transkriptu hnRNA CRH v PVN. Postnatálně stresovaní samci přitom vykazují o 2,7% nižší míru metylace v promotoru CRH v PVN oproti kontrolám (Chen et al. 2012). Bazální hladina mRNA CRH v PVN postnatálně stresovaných samců odpovídá hladině samců kontrolních. Ani samičí klidová hladina mRNA CRH v PVN se po prodělání maternální separace od hladiny kontrolních samic neliší. Nicméně hladina hnRNA CRH je po 4 hodinách maternální separace významně vyšší. Posttranskripčními úpravami je část molekul primárního transkriptu převedena na mRNA, část je degradována. Postnatálně stresované samice vykazují v dospělosti v promotoru pro CRH v PVN oproti postnatálně nestresovaným míru methylace nižší o 3,1%. Již na bazální úrovni jsou tak u samic hypometylace v promotoru patrné. (Chen et al. 2012).

K aktivitě HPA osy přispívá rovněž exprese AVP. Vystavení myších samců 3 hodinám maternální separace denně, způsobuje hypometylací v enhanceru, regulační oblasti zesilující expresi genu, pro AVP

v parvocelulárních neuronech PVN. Takto postnatálně stresovaná skupina vykazuje v PVN i vyšší hladinu mRNA AVP, zatímco vyšší hladina mRNA CRH nebyla pozorována (Murgatroyd et al. 2009). Vyšší hladina AVP v PVN u samců, kteří byli maternálně separováni, může být, podle jiného autora, příčinou změn v chování (Veenema et al. 2007).

Právě vyšší hladina AVP u takto stresovaných potkanů je patrně odpovědná i za vyšší hladinu mRNA POMC a kortikosteronu. Po aplikaci antagonisty AVP pro V1b receptor hladina POMC i GC u jedinců, kteří prošli maternální separací, klesá zhruba na hodnotu postnatálně nestresované skupiny (Murgatroyd et al. 2009). Hladina ACTH 4 hodiny denně maternálně separovaných samic je v dospělosti oproti samicím, které separovány nebyly, nižší. I přes nižší bazální hladinu plazmatického ACTH, je přitom koncentrace bazálního plazmatického kortikosteronu v dospělosti u postnatálně stresovaných samic vyšší (Chen et al. 2012).

3 hodiny trvající opakovaná maternální separace ovlivňuje v PVN hladinu ještě dalšího hormonu – oxytocinu. Jeho hladina je v parvocelulárních, nikoli však v magnocelulárních, neuronech laktujících samic, které byly pravidelně separovány od svých matek, oproti postnatálně nestresovaným laktujícím samicím nižší. Nižší hladina oxytocinu se pak může podílet na vzniku agresivnějšího chování, které takto stresované samice oproti samicím kontrolním vykazují (Veenema et al. 2007).

#### **4.4 Vliv postnatálního stresu v kombinaci se stresem v dospělosti na HPA osu**

Význam metylace v promotoru genu pro CRH u dospělých samců pravděpodobně spočívá především v prodloužené, a někdy také zvýšené, expresi po vystavení stresoru v dospělosti. Důsledkem nižší metylace v promotoru je sice po vystavení hypokinetickému stresu trvajícímu 30 minut oproti postnatálně nestresované kontrole pouze nesignifikantně vyšší hladina hnRNA CRH, exprese je ale prodloužená. Po 60 minutách trvajícímu hypokinetickému stresu je hladina u postnatálně stresovaných samců stále zvýšena, zatímco hladina kontrolní skupiny je již na výchozí hodnotě. Vystavení stresu v dospělosti ovlivňuje hladinu hnRNA, nicméně hladina mRNA ovlivněna není. Patrně tedy dochází k předčasnému ukončení transkripce (Chen et al. 2012). Rozdíl v bazální hladině hnRNA CRH a jeho hladině po vystavení hypokinetickému stresovému podnětu trvajícímu 30 minut v dospělosti je u postnatálně stresovaných samic menší u než u postnatálně nestresovaných. Obě skupiny po vystavení stresoru vykazují stejnou hladinu hnRNA CRH, nicméně výchozí hladina postnatálně stresovaných je vyšší, exprese je ale prodloužená. Hladiny mRNA CRH ovlivněny prenatálním stresem nejsou. Stejně jako u samců se tedy redukce metylace projevuje v prodloužené expresi po expozici akutnímu stresu (Chen et al. 2012).

Maternální separace v kombinaci s psychosociálním stresem v dospělosti ovlivňuje také hladiny AVP. Vystavení myších samců, kteří nebyli maternálně separováni, psychosociálnímu stresu vede k poklesu hladiny AVP v PVN. Naopak samci, kteří byli denně 3 hodiny separováni, vykazují v přítomnosti residenta vysokou hladinu AVP. Právě vysoká hladina AVP je pak možnou příčinou méně útočného a více úzkostného chování takto postnatálně stresovaných samců (Veenema et al. 2007).

Hladiny ACTH u myši a potkanů dosahují po vystavení časné maternální separaci a hypokinetickému stresoru v dospělosti různých hodnot. Možným vysvětlením mohou být genetické předpoklady. Juvenilní myši samci, kteří byli 3 hodiny denně separováni, vykazují při agresivních hrách vyšší hladinu kortikosteronu. Za vyšší plazmatickou hladinou kortikosteronu nicméně nestojí CRH, neboť jeho hladina v PVN odpovídá hladině kontrolní skupiny. Příčinou tak může být vyšší hladina AVP (Veenema et al. 2007). Dospělí myši samci, kteří byli na 3 hodiny denně separováni od matky, po 40 a 100 minutách hypokinetického stresu v dospělosti vykazují výrazně více plazmatického ACTH než postnatálně nestresovaní jedinci. Hladiny ACTH po vystavení hypokinetickému stresoru korelují s hladinami NA v PVN. NA přitom působí jako stimulant exprese CRH i ACTH. Možným vysvětlením vysoké hladiny NA v PVN může být redukované množství  $\alpha_2$  adrenergních receptorů v LC a mozковém kmeni (Liu et al. 2000). Naproti tomu dospělí potkaní samci, kteří byli 4 hodiny denně separováni, po vystavení akutnímu hypokinetickému stresu v dospělosti rozdíl v hladině ACTH oproti nestresovaným kontrolám nevykazují. Následná koncentrace kortikosteronu je však u postnatálně stresovaných potkanů oproti nestresovaným v dospělosti vyšší (Chen et al. 2012). U takto stresovaných jedinců tak patrně zároveň může docházet k alteracím v expresi receptorů či hormonů podílejících se na regulaci HPA osy.

U takto postnatálně stresovaných potkaních samic je rozdíl v hladině mRNA ACTH a koncentraci kortikosteronu větší než u samic kontrolních (Chen et al. 2012).



## 5 Vliv časného stresu na chování v dospělosti

V souvislosti s časným stresem je často sledováno úzkostné a depresivní chování, někdy také autismus a schopnost učení se v úlohách sledujících prostorovou orientaci.

Ovlivnění schopnosti učení se úlohám prostorové orientace časným stresem je patrně podmíněna genetickým pozadím. V kombinaci s časným stresem reagují i různé kmeny potkanů odlišně. Pokud byly matky potkanů kmene Wistar během gestace vystaveny 30 minutám hypokinetického stresu denně, samčí potomci v dospělosti v prostorovém učení vykazují deficity (Zagron & Weinstock 2006). Mezi samci, jejichž matky byly během gestace denně 45 minut hypokineticky stresovány, a prenatalně nestresovanými samci kmene Sprague-Dawley v učení prostorové orientace v dospělosti přitom není rozdíl (Zuena et al. 2008). Samice potkanů kmene Sprague-Dawley, které byly vystaveny tomuto prenatalnímu stresu se, oproti kontrolním samicím, v dospělosti v úlohách na prostorovou orientaci učí lépe (Zuena et al. 2008). U potkaních samic kmene Wistar po prodělaném chronickém prenatalním stresu prostorové učení ovlivněno není (Zagron & Weinstock 2006). Obecně tedy po tomto typu stresu dosahují samice v úlohách na prostorové učení lepších výsledků než samci.

Významnou mozkovou strukturou spjatou s prostorovým učním je hippokampus. Dorzální část souvisí s učním a pamětí, ventrální s limbickým systémem a emocemi. Prenatálně stresovaní samci, jejichž matky byly v době gestace vystaveny 3x 45 minutám hypokinetického stresu, mají oproti kontrolám sníženou neurogenezi v gyru dentatu, naopak hladina mozkového neurotrofického faktoru (brain derived neurotrophic factor, BDNF) je zde oproti kontrolní hladině vyšší. Ventrální hippokampus prenatalně stresovaných dospělých samců obsahuje méně mGlu1 receptorů, které podporují neurogenezi. Vysoká hladina BDNF tak může fungovat jako vyrovnávací mechanismus snížené neurogeneze. Jedinci jsou úzkostnější, výsledky v úlohách na prostorovou orientaci přitom odpovídají kontrolním výsledkům. Pozitivní zpětnovazebná smyčka mezi BDNF, neurogenézí a prostorovým učním je tak patrně narušena. Naopak ventrální a dorzální hippokampus prenatalně stresovaných samic obsahuje více mGlu1 receptorů oproti kontrolním samicím hippokampům, prenatalně stresované samice jsou méně úzkostné a v úlohách prostorové orientaci se učí lépe. Neurogeneze ani hladina BDNF u samic není prenatalním stresem ovlivněna (Zuena et al. 2008).

Paměť, ale také učení a další kognitivní schopnosti zahrnující komunikaci s ostatními jedinci, je u dospělých samců kmene Wistar poškozena rovněž jednorázovou aplikací 100µg LPS na kg váhy matky v 9. dni gestace. Chování samicích potomků ovlivněno není. Příznaky i prevalence odpovídají autismu u člověka, kdy jsou častěji postiženi muži. Autističtí jedinci vykazují abnormality a deficity ve společenském chování a kognitivních schopnostech, pro celkové chování jsou charakteristické často se opakující vzorce. Analýza mozku ukázala o čtvrtinu nižší hladinu tyrosinhydroxylázy ve striatu. Hydroxylací 3. uhlíku benzenového jádra tyrosinu vzniká dihydroxyfenylalanin, prekurzor dopaminu. Dopamin je přitom ve striatu takových potkanů redukován (Kirsten et al. 2010; Kirsten et al. 2012).

## 5.1 Úzkostné chování

Úzkostností se rozumí „psychologický a fyziologický stav a jím odpovídající chování způsobené skutečným a potenciálním ohrožením přežití a zdraví“ (Steimer 2002). Každé zvíře je přitom nuceno se neustále potýkat s vyhodnocováním bezpečnosti okolního prostředí. Na jedné straně vnitřního sporu stojí potřeba prozkoumat, na druhé pud sebezáchovy a potřeba držet se v bezpečí (Fonseca & Massoco 2002).

Megan Holmes se svým týmem v roce 2006 hledala odpověď na otázku, zda fetální programování chování souvisí se změnami hladin mateřské či fetoplacentální 11 $\beta$ HSD2. Použitím myší heterozygotních v expresi 11 $\beta$ HSD2(+/-) dávajících potomky +/+, +/- a -/- a homozygotních myší typu 11 $\beta$ HSD2(+/+) a 11 $\beta$ HSD2(-/-) prokázali, že 11 $\beta$ HSD2(-/-) potomci matek +/- nebo -/- matek vykazují více úzkostné chování než jejich +/+ sourozenci (Holmes et al. 2006).

### 5.1.1 Úzkostné chování a časný stres

U laboratorních zvířat je úzkostné chování hodnoceno pomocí několika modelových situací. První z nich je test otevřeného pole (open field test, OFT). Hodnocen je čas strávený v osvětleném centru arény a aktivita zvířete. Předpokládá se, že odvážnější zvířata tráví více času v centru arény, zatímco úzkostnější jedinci se drží spíše při stěně a centru se vyhýbají. Pohyb v centru otevřeného prostoru závisí také na intenzitě osvětlení. Při slabém osvětlení tráví postnatálně stresovaní myši samci v centru arény více času než nestresovaní. Vysvětlením může být podle George převládnutí potřeby prozkoumávat. Naopak při intenzivnějším osvětlení tráví samci, kteří byli opakovaně odloučeni od matky, více času na okraji. (George et al. 2010).

Další metodu představuje umístění zvířete do tzv. vyvýšeného křížového bludiště (elevated plus maze, EPM), které je vybaveno obvykle dvěma na koncích uzavřenými a dvěma otevřenými rameny. Variací představuje vyvýšené kruhové bludiště (elevated zero maze, EZM). EZM je tvořeno kruhovou dráhou a neobsahuje prostor mezi rameny, ve kterém by zvířeti bylo umožněno dlouhodobě trávit čas (viz Obrázek 4) (Heredia et al. 2013). Vyvýšená bludiště opatřená kamerou poskytují možnost sledovat několik parametrů úzkostného chování. Jedním ze sledovaných parametrů je počet nahlédnutí a vstupů do otevřených i uzavřených ramen. V průběhu testu vyvýšeného bludiště dochází obecně u všech zvířat prenatalně stresovaných i nestresovaných, k postupnému snižování vstupů do otevřených ramen EPM (Savignac et al. 2011; George et al. 2010).

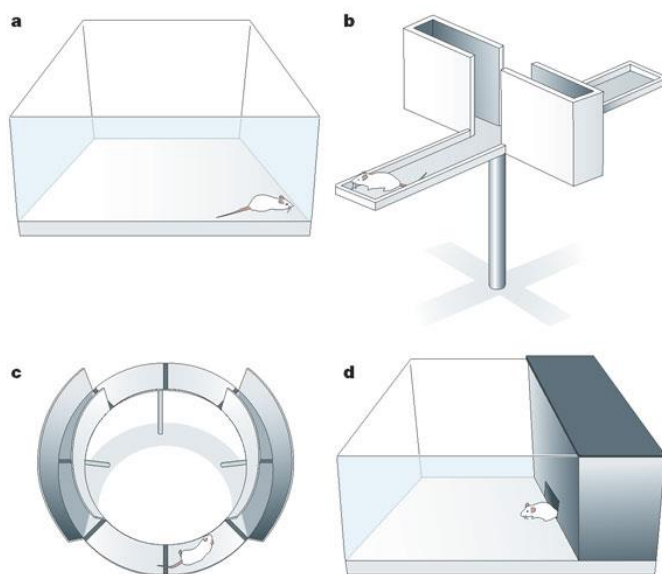
Je také hodnocen čas strávený v ramenech, pohybová aktivita zvířete, množství exkrementů vyloučených zvířetem během testu, latence pro vstup do ramen, čili doba, kterou zvíře potřebuje, než se odhodlá do ramene vstoupit.

Rozvoj úzkostného chování v souvislosti s prenatalním stresem závisí na pohlaví jedince. Ukazuje se, že u samců příliš nezáleží na povaze prenatalního stresoru, naopak pro rozvoj úzkostného chování samic povaha prenatalního stresoru důležitým parametrem je. Samčí potomci matek, které byly vystaveny 3x denně 45 minutám nebo 1x denně 10 minutám R-I, elektrickému šoku do chodidla nebo

240 minut denně restraint stresu vykazují delší latence ke vstupu do otevřených i uzavřených ramen EPM. Celkový počet vstupů i počet vstupů do otevřených ramen je u prenatalně stresované skupiny nižší (Zuena et al. 2008; Brunton & Russell 2010, Kohman 2008).

Naopak pokud byly matky v druhé polovině gestace vystaveny 3x denně 45 minutám hypokinetického stresoru, samičí potomci vykazují oproti prenatalně nestresovaným více času v otevřených ramenech a tedy méně úzkostné chování (Zuena et al. 2008). Samice, jejichž matky byly během gestace opakovaně po dobu 10 minut umisťovány do klece laktující samice, přitom v úzkostnosti oproti prenatalně nestresovaným nevykazují rozdíl. Již před testováním však prenatalně stresované samice vykazují vyšší aktivitu než prenatalně nestresované kontrolní samice i než samci. Příčinou může být vyšší bazální hladina AVP (Brunton & Russell 2010).

Dospělí myši samci, kteří byli denně 3 hodiny separováni od matky, vstupují méně často do otevřených ramen EPM než postnatálně nestresovaní samci. Do uzavřených ramen však jedinci, kteří byli separováni, vstupují častěji. V uzavřených ramenech EPM takto postnatálně stresovaní samci vykazují vyšší pohybovou aktivitu, v otevřených ramenech není rozdíl oproti kontrolní skupině. Hyperreaktivita přetrvávající i druhý den dle George poukazuje na to, že se nejedná o bezprostřední reakci na nové prostředí (George et al. 2010).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Drug Discovery

Obrázek 4 Modelové situace 4 typů, **a** test otevřeného pole, **b** vyvýšené křížové bludiště, **c** vyvýšené kruhové bludiště, **d** light/dark box (ze 2/3 tvořen osvětleným prostorem, z 1/3 skýší). Převzato z *Cryan & Holmes 2005*

### 5.1.2 Vliv časného stresu na centrální regulaci spjatou s úzkostným chováním

Zatímco v hypothalamu GC expresi CRH inhibují, v amygdale ji aktivují (Shepard et al. 2000). Právě vysoká hladina CRH v amygdale může být podle Sheparda a Myerse odpovědná za regulaci úzkostného

chování. U potkanů kmene Wistar-Kyoto byla pozorována vyšší bazální hladina CRH v amygdale a po vstupu do EPM úzkostnější chování než u kmene Fisher (Shepard & Myers 2008).

Hladina CRH v amygdale je ovlivněna prenatálním stresem, účinek raně postnatálního však není pozorován. Dospělí potkani, jejichž matky byly denně vystavovány 10 minutám hypokinetického či psychosociálního stresu denně v době gestace, vykazují v klidu oproti prenatálně nestresovaným kontrolám vyšší hladinu CRH v CeA amygdaly (Brunton & Russell 2010; Zohar & Weinstock 2011). Hladina CRH dospělých samců, kteří byli vystaveni LPS či denně 3 hodiny separování od matky, odpovídá hladině samců kontrolních (Wang et al. 2012; Chen et al. 2012).

Důležitým faktorem regulujícím vznik úzkostného chování jsou kortikoliberinové receptory CRHR1 a CRHR2. Obecně myši s vyřazeným genem pro CRHR1 vykazují méně úzkostné chování. Jeho funkce však není čistě anxiolytická, v některých oblastech mozku může mít i opačnou úlohu. Selektivní vypnutí funkce genu pro CRHR1 v dopaminergních neuronech středního mozku je asociováno s výraznějším úzkostným chováním, přičemž dochází k oslabení dopaminových drah v prefrontální kůře. Naopak myši s vyřazeným genem v glutamatergních neuronech předního mozku vykazují méně úzkostné chování a oslaben je synaptický přenos v amygdale a hippocampu (Refojo et al. 2011; Wang et al. 2012). Potomci matek vystavených v době gestace kombinaci stresorů denně vykazují rozdíly v závislosti na pohlaví. Zatímco samci mají v dospělosti v CeA v klidu nižší hladinu CRHR1 oproti prenatálně nestresovaným kontrolám, hladina samičích receptorů není prenatálním stresem ovlivněna. Naopak umístění samce do EPM nevyvolá změnu v expresi ani u jedné skupiny, samice, které byly prenatálně stresovány však exprimují CRHR1 více než samice prenatálně nestresované (Zohar & Weinstock 2011). Vazba CRH na CRHR1 v amygdale iniciuje hydrolýzu endokanabinoidu anandamidu. Právě anandamid může úzkostné chování i reaktivitu HPA osy tlumit (Gray et al. 2015).

Stejně tak může na úzkostné chování a aktivitu HPA osy působit inhibičně vazba CRH na receptor CRHR2 v amygdale (Bale et al. 2000). Samice, které byly prenatálně stresovány, vykazují vyšší aktivitu HPA osy i úzkostnější chování než samice nestresované i než obě samčí skupiny. Hladina CRHR2 je přitom právě u takových samic redukována. V amygdale prenatálně stresovaných samců je CRHR2 exprimováno ve vyšší míře oproti amygdale samců prenatálně nestresovaných. Po vstupu do EPM dochází u obou skupin ke zvýšení jeho exprese (Zohar & Weinstock 2011).

Samičí bazální exprese regulačního CRH-BP v amygdale není ovlivněna 45 minutami hypokinetického stresu pregnantní matky, nicméně po vstupu do EPM vzrůstá. U prenatálně stresovaných samců je v klidu hladina nižší oproti kontrolám, po vstupu do EPM se míra exprese CRH-BP v amygdale nemění. V PVN je klidová exprese CRH-BP v dospělosti u samců vystavených v prenatálním období různým stresorům oproti prenatálně nestresovaným nižší. Stejně tak je i u samic po kombinaci stresorů v prenatálním období klidová exprese CRH-BP v dospělosti v PVN nižší oproti prenatálně nestresovaným kontrolám (Zohar & Weinstock 2011).

Příčina úzkostného chování může vést také v aktivitě mozkových buněk imunitního systému. Kromě mikroglií je v myším mozku přítomen ještě 1 typ imunitních buněk – mastocyty. Jejich degranulace je

aktivována právě hormonem CRH. Granula žírných buněk obsahují celou řadu cytokinů, ale i histamin a serotonin, které právě mohou mít anxiolytické účinky a podporovat neurogenezi (Theoharides et al. 1996). Jsou lokalizovány především v oblastech thalamu a hippocampu (Nautiyal et al. 2008). Myši deficientní v centrálních mastocytech či s blokovanými mozkovými žírnými buňkami vykazují více úzkostné chování než kontroly s fungujícími žírnými buňkami. (Nautiyal et al. 2008; Lytinas et al. 2003).

## 5.2 Depresi podobné chování

Na základě testu nuceného plavání (forced swim test, FST), kdy je zvíře umístěno do válce s vodou, jsme schopni rozlišit 3 typy lokomoce. Při aktivním plavání jsou zapojeny do pohybu všechny končetiny, mírně plavající zvíře používá pouze 1 či 2, zvíře imobilizované neplave, pouze se snaží udržet hlavu nad vodou. Imobilita je v tomto případě interpretována jako depresi podobné chování. Stresovaná zvířata vydrží mírně plavat kratší dobu než zvířata nestresovaná a delší dobu stráví v imobilizovaném stavu (George et al. 2010). Myši samci, kteří byli v prvních 10 dnech po narození po dobu 3 hodiny denně separováni od matky, jsou, oproti nestresovaným kontrolám, v dospělosti při FST více imobilní (Murgatroyd et al. 2015).

Jinou metodu umožňující hodnotit depresi podobné chování představuje test preference sacharózy. Zvíře je umístěno do prostoru se dvěma lahvemi, jedna obsahuje 1% sacharózu, druhá pouze vodu. Zdravý jedinec vybírá přednostně lahev se sacharózou, lhostejnost vůči výběru, tedy zde anhedonie, je u zvířat považována za projev depresivního chování.

Výsledky experimentů poukazují na souvislost deprese podobného chování a přítomnosti cytokinu známého jako tumor nekrotický faktor  $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF $\alpha$ ) a jeho receptorů dvou typů (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1; tumor necrosis factor receptor 2, TNFR2) v mozku. U potkanů je TNFR1 vystavován na povrchu astrocytů, oligodendrocytů i mikroglií. Pouze pro mikroglii je charakteristická i přítomnost TNFR2 (Dopp et al. 1997). Zvířata s knocknoutovanými TNFR1 nebo TNFR2 jsou více mobilní než zvířata kontrolní. Rozdíl v mobilitě oproti kontrolám je výraznější u homozygotů neexprimujících TNFR1. V testu preference sacharózy se jeví jako méně lhostejné myši, které neexprimují TNFR2. Souvislost TNF $\alpha$  s depresi podobným chováním vysvětluje Simen dvěma teoriemi, metabolismem 5-HT v hippocampu a redukovanou neurogenezí v hippocampu a subventrikulárním jádře. V hippocampu zvířat, která mají chronicky zvýšenou hladinu TNF $\alpha$ , je 5-HT méně dostupný. Naopak akutní vzrůst hladiny TNF $\alpha$  zvyšuje dostupnost 5-HT. Teorie redukované neurogeneze je opřená o studie objemů lidských hippocampů (Hayley et al. 1999; Simen et al. 2006).

Hippokampus potkaních samců, jejichž matky byly v době gestace 3x denně 45 minut hypokineticky stresovány, vykazuje o 45% nižší schopnost proliferace oproti schopnosti proliferace hippocampu prenatálně nestresované skupiny. Vyšší hmotnost nadledvin pak poukazuje na hyperaktivní HPA osu (Lemaire et al. 2000). Hyperaktivita HPA osy se na depresi podobném chování přitom může také podílet (Zhu et al. 2014). V hippocampu takto prenatálně stresovaných myších samců jsou pozorovány vyšší

bazální hladiny právě mRNA TNF $\alpha$  a mRNA IL-1 $\beta$ . Po aplikaci pyrogenu dospělým jedincům dochází k signifikantnímu vzrůstu hladiny TNF- $\alpha$  přitom pouze u prenatálně stresovaných jedinců. Hladina IL-1 $\beta$  se v hippocampu zvyšuje nezávisle na prenatálním stresu (Diz-Chaves et al. 2013).

U dospělých potkaních chronicky stresovaných samců, u kterých, na základě výsledků z testu preference sacharózy, dochází ke vzniku a prohlubování depresi podobného chování, je sledován postupný úbytek v hippocampálním objemu. Rychlost úbytku je větší pro levý hippocampus (Luo et al. 2014). U myši je levý hippocampus, konkrétně oblast CA3, důležitá struktura pro vznik dlouhodobé paměti, na molekulární úrovni představované mechanismem dlouhodobé potenciace (long-term potentiation) Za ukládání krátkodobé paměti, krátkodobé potenciace (short-term potentiation) jsou odpovědné CA3 oblasti obou hemisfér (Shipton et al. 2014). Pyramidové neurony hippocampálních oblastí CA1 a CA3 po prvním měsíci života vykazují u myších samců s deletovaným genem pro TNF- $\alpha$  řidší větvení, přitom hippocampus takových jedinců vykazuje dospělý fenotyp (Golan et al. 2004). Po prostorovém učení (spatial learning, visible platform trainig) je u myších samců bez TNF- $\alpha$  v levém i pravém hippocampu vyšší hladina NGF. V hladinách BDNF není rozdíl. NGF navozuje buněčné dělení, BDNF podporuje v různých oblastech mozku větvení, axonální růst, v hippocampu pak i tvorbu synapsí (Golan et al. 2004). Potkaní samci, kteří byli denně 3 hodiny separováni od matky, vykazují v dospělosti vyšší hladinu kortikosteronu v krvi a NGF v hippocampu než samci postnatálně nestresovaní. Vyšší hladina NGF v časném období může představovat vyrovnávací mechanismus za narušení a s dalším vývojem se patrně srovnává na kontrolní hladinu (Daniels et al. 2010).

## 6 Vliv časného stresu na imunitu

Pojem imunita představuje soubor rozmanitých mechanismů sloužících organismu k rozpoznávání tělu vlastním, obraně proti cizím a degradaci vlastních, nefunkčních částic. Příliš intenzivní, dlouhotrvající nebo nesprávně použité reakce či dokonce reakce zaměřené proti vlastním tkáním však mohou organismus spíše poškodit, proto jsou pro tělo rozmanité mechanismy regulující imunitní odpovědi nezbytné. Za příklad imunomodulačního mechanismu lze považovat právě i stresovou reakci, přičemž v závislosti na intenzitě může působit na imunitní systém protichůdným způsobem. Nízké dávky endogenních aktivních GC působí obvykle na imunitní systém stimulačně a prozánětlivě, zatímco chronický stres, vysoké dávky GC či syntetické GC, jakým je např. dexamethason, imunitní reakce organismu naopak tlumí (Dhabhar 2014).

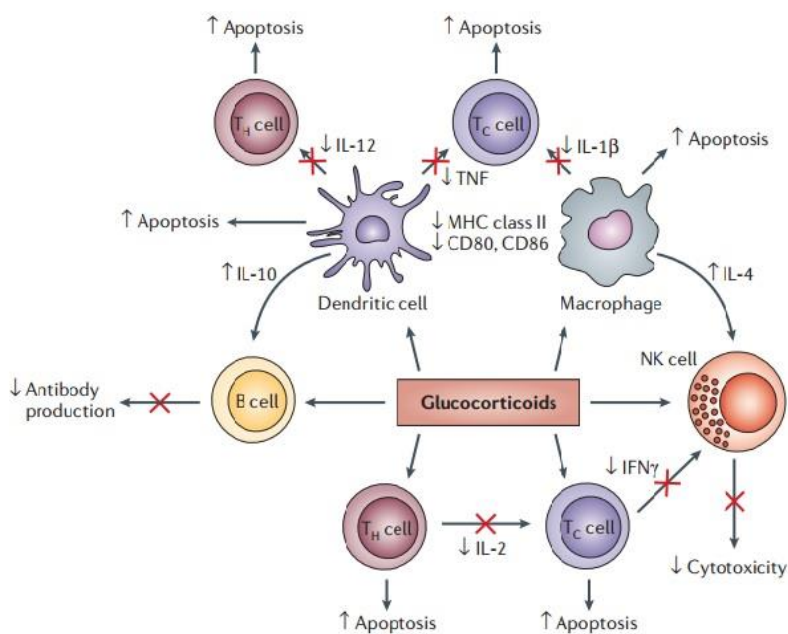
Ve vývoji imunitního systému existují značné mezidruhové rozdíly dané délkou prenatálního i postnatálního vývoje. Tak například kolonizace thymu a vývoj lidských T-lymfocytů začíná v prvním trimestru, zatímco u myši se tentýž proces odehrává až od pozdní poloviny gestace (Holladay & Smialowicz 2000).

### 6.1 Cytokiny

Molekuly, které zprostředkovávají signalizaci převážně mezi buňkami asociovanými s imunitním systémem, se nazývají cytokiny. Díky svým pleiotropním účinkům působí často i v regulaci nervové a hormonální soustavy. TNF $\alpha$  ovlivňuje hladiny NGF a BDNF a expresi TNFR1 v oligodendrocytech a TNFR2 v mikroglíích (Golan et al. 2004; Simen et al. 2006), IL-1 $\beta$  má aktivační účinky na HPA osu (Brunton & Russell 2010), INF $\gamma$  aktivuje expresi TNFR2 a

TNFR1 v mikroglíích, TNFR1 pak i v oligodendrocytech a astrocytech (Simen et al. 2006).

Často jsou cytokiny na základě podpory zánětlivé odpovědi rozdělovány do dvou skupin, mezi kterými ale neexistuje striktní hranice. Do skupiny prozánětlivých cytokinů je často řazen TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ale i interleukin-6 (IL-6). Práce Opal & DePalo a Zhang & An ale upozorňují, že právě IL-6 zároveň



Obrázek 5: Dlouhotrvající zvýšená hladina glukokortikoidů působí protizánětlivě. Pokles hladiny prozánětlivých cytokinů je dán inhibicí exprese, ale i indukci apoptózy buněk, které tyto látky produkují. Naopak, exprese protizánětlivých cytokinů je glukokortikoidy podporována. Převzato z Sternberg 2006

může prozánětlivé cytokiny inhibovat a řadí se tak rovněž mezi cytokiny protizánětlivé (Opal & DePalo 2000; Zhang & An 2009).

Řada lymfatických orgánů exprimuje enzym 11 $\beta$ -HSD1, exprese 11 $\beta$ -HSD1 je podporována cytokiny charakteristickými pro Th2 buňky, jakými jsou interleukiny 1 $\beta$  a 4, a tlumena Th1 cytokiny, např. INF $\gamma$  (Tomlinson et al. 2004). Sama 11 $\beta$ -HSD1 působí inhibičně na expresi prozánětlivých cytokinů interleukinu 2 (IL-2) a INF $\gamma$ , stimulačně pak na expresi protizánětlivých interleukinů 4 a 10 (Hennebold et al. 1996).

### **6.1.1 Vliv časného stresu na prozánětlivé cytokiny**

Pozorováním juvenilních potkaních samců v 7. týdnu života a dospělých potkaních samců v 6. měsíci života byl vysledován vliv časného stresu na vývoj imunitního systému. V bazální plazmatické hladině IFN- $\gamma$  není rozdíl mezi prenatalně stresovanými, jejichž matky byly 3x denně vystavovány hypokinetickému stresu, a prenatalně nestresovanými potkaními samci v juvenilní fázi života ani v dospělosti. V periferních buňkách imunitního systému je však v bazálním stavu obsah INF- $\gamma$  v dospělosti u prenatalně stresovaných oproti prenatalně nestresovaným větší. Tyto buňky mohou být aktivovány rostlinným lektinem fytohemaglutininem. U mladých samců po aplikaci fytohemaglutininu vliv prenatalního stresu na hladinu IFN- $\gamma$  nebyl zaznamenán. V dospělosti však fytohemaglutinin způsobuje u prenatalně stresovaných samců oproti prenatalně nestresovaným větší produkci tohoto cytokinu. Možnou příčinu zvýšené exprese IFN- $\gamma$  může být aktivita NK a CD8<sup>+</sup> buněk (Vanbesien-Mailliot et al. 2007).

Expresí interleukinu 5 (IL-5) je v periferních buňkách imunitního systému mladých prenatalně stresovaných samců oproti nestresovaným v klidu zvýšena, v hladině IL-6 nevykazují skupiny rozdíl. Mladí samci, kteří byli prenatalně stresováni, po aktivaci rostlinným lektinem fytohemaglutininem vykazují více IL-5 a IL-6 oproti mladým prenatalně nestresovaným samcům (Vanbesien-Mailliot et al. 2007).

Také v centrální nervové soustavě (CNS) jsou zánětlivé odpovědi ovlivněny prenatalním stresem. Zánět v CNS přitom může souviset se vznikem depresi podobného chování. V dospělosti v bazálním stavu vykazují prenatalně stresovaní myši samci, jejichž matky byly vystaveny 45 minutám hypokinetického stresu denně, vyšší hladinu TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$  v gyru dentatu a CA1 hippokampu oproti prenatalně nestresovaným. V reakci na LPS dochází u obou skupin ke zvýšení hladin TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Příčinou vyšší hodnoty rozdílu v hladinách TNF $\alpha$  u prenatalně stresované skupiny může být vyšší aktivita mikroglíí. Vyšší hladiny těchto cytokinů v hippokampu mohou způsobovat depresi podobné chování (Diz-Chaves et al. 2013). Hladina IL-1 $\beta$  v kortexu je u myši obou pohlaví, jejichž matky byly denně uzavírány na 240 minut do těsného prostoru, asi dvojnásobně větší než u prenatalně nestresovaných. V obou případech je reakce samců dvojnásobná oproti reakci samicí (Kohman et al. 2008).



### **6.1.2 Vliv časného stresu na protizánětlivé cytokiny**

Hladiny mRNA protizánětlivého IL-10 v periferních imunitních buňkách u mladých samců nejsou ovlivněny vystavením matky v době gestace 3x denně 45 minutám hypokinetického stresoru. Hladina mRNA IL-2 však je po prenatálním stresu oproti kontrolní hladině u mladých potkanů nižší. Ani jeden z cytokinů není ovlivněn aplikací fytohemagglutininu (Vanbesien-Mailliot et al. 2007).

## **6.2 Nespecifická složka imunity**

Mechanismy imunitního systému lze rozdělit na základě adaptivnosti. Vývojově starší je neadaptivní složka imunitního systému tvořena souborem buněk a hormonů, které jsou v organismu na patogeny již předem připravené. Neadaptivní, nebo také vrozené, imunitní mechanismy reagují s evolučně konzervovanými patogenními strukturami. Neadaptivní složku imunity tvoří buňky fagocytující, například makrofágy, a cytotoxické buňky, jakými jsou granulocyty a NK buňky.

### **6.2.1 Vliv časného stresu na nespecifickou složku imunity**

Alteraci vývoje vlivem časného stresu kromě vývoje hladin cytokinů dokládá i vývoj složení imunitních buněk. Opakovaná aplikace mírného elektrického proudu do chodidel pregnantní myši matky může ovlivnit procentuální zastoupení makrofágů vůči ostatním periferním imunitním buňkám jejích potomků. Potomci takových matek vykazují po aplikaci proudu 30. dne života vyšší procentuální zastoupení makrofágů, než jedinci, kteří prenatálně stresováni nebyli či byli stresováni pouze postnatálně. Nicméně po aplikaci v dospělosti, 60. dne života, je průměrné procentuální zastoupení makrofágů u skupiny, která byla stresována i prenatálně, nejnižší ( $22 \pm 5\%$ ). Nejvyšším procentuálním zastoupením pak oplývá skupina pouze postnatálně stresovaných samců ( $56 \pm 6\%$ ) (Fonseca & Massoco 2002).

Rozdíly jsou ale pozorovány i mezi věkově si odpovídajícími potkany. Dospělí, 5-6 měsíců staří, samci potkanů kmene Long-Evans, jejichž matky byly vystaveny v době gestace 2 hodiny R-I stresu denně, vykazují větší množství granulocytů v krvi oproti kontrolnímu prenatálně nestresovaným jedincům. Množství a aktivita monocytů a přirozeně zabíjejících buněk (natural killers, NK) je oproti kontrole nižší (Götz et al. 2007). Zajímavé je, že u šestiměsíčních potkaních samců kmene Sprague-Dawley, jejichž matky byly v době gestace vystaveny 3 x denně 45 minutám hypokinetického stresu, jsou v dospělosti NK buňky v bazálním stavu přítomny ve větším množství oproti prenatálně nestresované kontrole (Vanbesien-Mailliot et al. 2007). Výsledný poměr počtu NK buněk prenatálně stresovaných jedinců vůči počtu NK buněk prenatálně nestresovaných kontrol je opačný, přestože se v obou případech jednalo o psychický stres. Bližší informace o charakteru prenatálního stresoru spolu s informacemi o genetickém pozadí jsou v tomto případě patrně klíčovými údaji při zkoumání vlivu prenatálního stresu na dospělý fenotyp.

Byl rovněž pozorován vliv prenatálního stresu na reaktivitu imunitních buněk CNS. Prenatálně stresovaní myši samci, jejichž matky byly 3x denně vystaveny 45 minutám hypokinetického stresu, sice vykazují stejné množství imunoreaktivních astrocytů a mikroglií v CA1 hippokampu, oproti kontrolní

skupině ale vykazují větší procento reaktivního fenotypu v gyru dentatu. Po aplikaci LPS se počet imunoreaktivních mikroglií u prenatalně stresovaných samců v gyru dentatu zvyšuje, u nestresovaných ke zvýšení počtu nedochází (Diz-Chaves et al. 2013).

### **6.3 Specifická složka imunity**

Enzym 11 $\beta$ -HSD1 je exprimován v CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech i v B-lymfocytech (Zhang et al. 2005). V CD4<sup>+</sup> buňkách GC indukují expresi IL-2 a IFN- $\gamma$  (Zhang et al. 2005). Přítomnost IFN- $\gamma$  spolu s interleukinem 12 (IL-12) rozhoduje o diferenciaci pomocných T-lymfocytů (T-helpers, Th). Tyto cytokiny jsou produkovány především makrofágy a dendritickými buňkami. Podporují diferenciaci prekurzorových CD4<sup>+</sup> buněk v Th buňky prvního typu (Th1), zatímco brání diferenciaci v Th buňky druhého typu (Th2). IL-4 podporuje diferenciaci v Th2 buňky a inhibuje diferenciaci v Th1. Oba typy buněk dále diferenciaci ve svůj typ podporují pozitivně zpětnovazebnou produkcí těchto hormonů. V proliferaci T-lymfocytů hrají GC důležitou roli, zatímco v nízké koncentraci mohou působit stimulačně na proliferaci, vysoké koncentrace spouští obvykle GC-indukovanou apoptózu (Pascuan et al. 2014).

#### **6.3.1 Vliv časného stresu na specifickou složku imunity**

GR v cytoplasmě spouští kinázové signalizační dráhy, nebo interagují přímo v jádře s elementem odpovídajícím na glukokortikoidy (glucocorticoid-response element, GRE) v oblasti promotoru. Rovněž samotné GR bez navázaných GC mohou interagovat s různými oblastmi DNA, vyvolávají remodelaci chromozomu, která ústí buď v aktivaci či supresi exprese různých genů a mohou vést k apoptóze T-lymfocytů v thymu (Baschant & Tuckermann 2010).

Umístění matky v době gestace 3x denně po dobu 45 minut do těsného prostoru může být příčinou vyššího bazálního množství CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a B-lymfocytů samčích potomků oproti samcům prenatalně nestresovaným. Prenatálně stresovaná skupina disponuje tedy i vyšším poměrem CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> oproti skupině prenatalně nestresované. Právě přítomnost CD8<sup>+</sup> ve větším množství může souviset s vyšší hladinou INF- $\gamma$  po aplikaci fytohemaglutininu (Vanbesien-Mailliot et al. 2007). Množství a aktivita pomocných CD4<sup>+</sup> a cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a B-lymfocytů potomků matek, které byly po celou dobu gestace umístovány na 2 hodiny denně do terária jiných samic, je oproti množství prenatalně nestresovaných jedinců nižší (Götz et al. 2007). Příčinou jiného množství a aktivity CD8<sup>+</sup> je patrně pozměněná selekce v thymu, který je inervován noradrenergně, ale reaguje i na přítomnost aktivních GC (Vanbesien-Mailliot et al. 2007, Götz et al. 2007). U prenatalně nestresovaných myších samic působí kortikosteron v nízké koncentraci pozitivně na proliferaci T-lymfocytů v lymfatických uzlinách, naopak vysoké koncentrace působí negativně. Proliferace buněk prenatalně stresovaných samců, jejichž matky byly vystavovány 2 hodiny denně hypokinetickému stresu, pozitivně ovlivněna není, avšak inhibice proliferace je při vysoké koncentraci oproti kontrolám ještě výraznější. Adrenalin a noradrenalin působí stimulačně na T-lymfocyty také pouze u kontrolních jedinců. Různý účinek může být dán množstvím glukokortikoidních receptorů (Vanbesien-Mailliot et al. 2007, Pascuan et al. 2014).

Humorální složku specifické imunity představují signální molekuly zvané imunoglobuliny. O účincích časného stresu na humorální imunitu není příliš známo, nicméně v článku Franze Veru jsou shrnuty rozdíly ve výsledcích po prodělání stresoru různého charakteru, podle Sobrian 1992 by měla aplikace elektrického proudu do chodidel matek během gestace způsobit nižší hladinu plazmatického IgG novorozených samic, samic v prvním týdnu života a během odstavení (Veru et al. 2014). U mladých (3 týdny života) ani dospělých potkaních samců po vystavení matky 3x denně 45 minutám hypokinetického stresu během gestace není ovlivněno množství ani zastoupení protilátek typu IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgM a IgA v krvi (Vanbesien-Mailliot et al. 2007). Vystavení matky 2 hodinám hypokinetického stresu však má vliv na protilátkovou odpověď na akutní psychický stresor dospělých samiček potomků. Zatímco u prenatálně nestresovaných myších samic hypokinetický stres matky zvyšuje množství IgG protilátek v krvi, prenatálně stresovaná skupina vykazuje v množství IgG pokles (Pascuan et al. 2014).

## 7 Závěr

Od antického Řecka, kdy Hippokrates na přelomu 5. a 4. století před naším letopočtem poprvé rozlišil u člověka 4 typy temperamentu dané převládající tělesnou šťávou, uběhla řada staletí. Dnes se ukazují nejen u člověka, ale i spousty ostatních obratlovců, značné povahové rozdíly. Jsme schopni již alespoň částečně objasnit příčiny odlišných fyzických i psychických reakcí jedinců a jejich vnější projevy, třeba právě v zátěžových situacích. Molekulární genetika a příbuzné obory také vyvrací představy, že nelze než se smířit s tím, co bylo jedinci při početí dáno do vínku. Ukazuje se, že epigenetické modifikace umožňují, ačkoli nikterak pružné, přizpůsobení organismu určitým podmínkám. Dochází k metylacím v oblasti promotoru a vazbě proteinů v regulačních oblastech genů. Tyto a další mechanismy znemožňují nebo naopak aktivují expresi příslušného genu. Tak se u jedince, který byl v raně postnatálním životě pravidelně a opakovaně po delší časový úsek odloučen od matky, sníží míra metylace v promotoru pro výchozí stresový hormon – kortikoliberin. Ten je následně při zátěži snáze a ve vyšší míře exprimován. Různá míra exprese CRH v dospělosti u prenatalně stresovaných je nejspíše dána povahou stresoru, kterému byla matka během gestace vystavena a může se projevit i v bazálním stavu. Časný stres rovněž může ovlivňovat expresi argininu vazopresinu. Expresí obou těchto hormonů je prvním krokem na cestě k aktivaci exprese glukokortikoidů. GC v mozku po vazbě na své receptory následně reaktivitu HPA osy tlumí. Jejich účinky v mozku však mohou být značně regulovány. Jedním z mechanismů je vazba k transkortinu, která usnadňuje pohyb v polárním vodném prostředí krve, nicméně znemožňuje difuzi přes hematoencefalickou bariéru. Ukazuje se, že prenatalní malnutrice může nastavit nižší míru exprese v dospělosti. Malnutrice rovněž může způsobit vyšší míru exprese receptorů pro GC. Naopak vystavení matky v době gestace 10 minutám psychosociálního stresu může stát za nižší mírou exprese receptorů pro glukokortikoidy. Vyšší hladina receptorů přitom urychluje utlumení HPA osy. Autoři některých studií uvádějí, že právě hyperreaktivita HPA osy stojí za úzkostným či depresi podobným chováním dospělých jedinců. Úzkostné chování je patrné zejména u prenatalně stresovaných samic. Brunton & Russell upozorňují na změny v chování samic během estrálního cyklu. Během metestru a diestru, čili po možném oplození, vykazují úzkostnější chování než během proestru a estru, fázích dozrávání folikulů, ovulace a možného oplození. Naopak Zohar & Weinstock po umístění samic do vyvýšeného bludiště vliv estrálního cyklu na úzkostné chování nepozorují.

Změny v chování jsou přitom pozorovány také v souvislosti s přítomností některých cytokinů a jejich receptorů v mozku, zejména pak TNF $\alpha$ . Na periférii jsou pak časným stresem ovlivňovány nejen hladiny cytokinů, ale i procentuální zastoupení a reaktivita imunitních buněk. Pro dospělost mohou být v závislosti na povaze prenatalního stresoru nastavena množství monocytů i NK buněk, poměr CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> lymfocytům, hladiny prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů. Známé tlumivé účinky chronické vysoké hladiny GC na imunitní systém doplňuje Dhabar o upozornění na podpůrné účinky akutní mírně zvýšené hladiny GC.

## 8 Literatura

- Amath, A., Foster, J.A. & Sidor, M.M., 2012. Developmental alterations in CNS stress-related gene expression following postnatal immune activation. *Neuroscience*, 220, pp.90–99.
- Andersen, S.L., 2003. Trajectories of brain development : point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, pp.3–18.
- Bains, J.S., Cusulin, J.I.W. & Inoue, W., 2015. Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. *Nature Publishing Group*, 16, pp.377–388.
- Bale, T.L. et al., 2000. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nature Genetics*, 24, pp.410–414.
- Baschant, U. & Tuckermann, J., 2010. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120, pp.69–75.
- Bowers, S.L. et al., 2007. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behavior and Immunity*, 22, pp.105–113.
- Brunton, P.J. & Russell, J.A., 2010. Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects. *Journal of Neuroendocrinology*, 22, pp.258–271.
- Carr, C.P. et al., 2013. The role of early life stress in adult psychiatric disorders: a systematic review according to childhood trauma subtypes. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 201, pp.1007–1020.
- Cryan, J.F. & Holmes, A., 2005. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature*, 4, pp.775–791.
- Daniels, W.M.U. et al., 2010. Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 17 glucocorticoid receptor promoter region. *Metabolic Brain Disease*, 24, pp.615–627.
- Dhabhar, F.S., 2014. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Journal of Immunology Research*, 58, pp.193–210.
- Diz-Chaves, Y. et al., 2013. Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice. *Brain Behavior and Immunity*, 28, pp.196–206.
- Dopp, J.M. et al., 1997. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *Journal of Neuroimmunology*, 75, pp.104–112.
- Ergang, P. et al., 2015. Differential impact of stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis: gene expression changes in Lewis and Fisher rats. *Psychoneuroendocrinology*, 53, pp.49–59.
- Fonseca, E.S.M. & Massoco, C.O., 2002. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiology & Behavior*, 77, pp.205–215.
- George, E.D. et al., 2010. Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. *BMC Neuroscience*, 11, pp.1–14.
- Golan, H. et al., 2004. Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function. *Cerebral Cortex*, 14, pp.97–105.
- Götz, A.A., Wittlinger, S. & Stefanski, V., 2007. Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat offspring during stressful life-events. *Journal of Neuroendocrinology*, 185, pp.95–102.
- Gray, J.M. et al., 2015. Corticotropin-releasing hormone drives anandamide hydrolysis in the

- amygdala to promote anxiety. *Journal of Neuroscience*, 35, pp.3879–3892.
- Hashimoto, M. et al., 2001. Modulating effects of prenatal stress on hyperthermia induced in adult rat offspring by restraint or LPS-induced stress. *Physiology & Behavior*, 73, pp.125–132.
- Hayes, Y. et al., 1996. Glucocorticoids differentially increase nerve growth factor and basic fibroblast growth factor expression in the rat brain. *Journal of Neuroscience*, 16, pp.2141–2148.
- Hayley, S. et al., 1999. Sensitization to the effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ : neuroendocrine, central monoamine and behavioral variations. *Journal of Neuroscience*, 19, pp.5654–5665.
- Hennebold, J. et al., 1996. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs. *The American Journal of Physiology*, 270, pp.1296–1306.
- Heredia, L. et al., 2013. Assessing anxiety in C57BL / 6J mice : A pharmacological characterization of the zero maze test. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 68, pp.275–283.
- Holladay, S.D. & Smialowicz, R.J., 2000. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environmental Health Perspectives*, 108, pp.463–473.
- Holmes, M.C. et al., 2006. The Mother or the fetus? 11- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *Journal of Neuroscience*, 26, pp.3840–3844.
- Chen, J. et al., 2012. Maternal deprivation in rats is associated with corticotropin releasing hormone (CRH) promoter hypomethylation and enhances CRH transcriptional responses to stress in adulthood. *Journal of Neuroendocrinology*, 24, pp.1055–1064.
- Jurek, B. et al., 2015. Oxytocin regulates stress-induced Crf gene transcription through CREB-regulated transcription coactivator 3. *Journal of Neuroscience*, 35, pp.12248–12260.
- Karolyi, I.J. et al., 1999. Altered anxiety and weight gain in corticotropin-releasing hormone-binding protein-deficient mice. *Neurobiology*, 96, pp.11595–11600.
- Kim, Y.S. & Kim, Y., 1975. Glucocorticoid inhibition in vivo and in vitro of protein synthesis. *Journal of biological chemistry*, 250, pp.2293–2298.
- Kirsten, T.B. et al., 2013. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1 $\beta$  levels in adult rat offspring: relevance to autism. *PLoS ONE*, 8, p.e82244.
- Kirsten, T.B. et al., 2010. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. *Behavioural Brain Research*, 211, pp.77–82.
- Kohman, R.A. et al., 2008. Influence of prenatal stress on behavioral, endocrine, and cytokine responses to adulthood bacterial endotoxin exposure. *Behavioural Brain Research*, 193, pp.257–268.
- Koolhaas, J.M. et al., 2013. The Resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. *Journal of Visualized Experiments*, 77, pp.1–7.
- Kuhar, M.J., Couceyro, P.R. & Lambert, P.D., 1999. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects 6th ed., Lippincott-Raven, pp.218–221, ISBN: 0-397-51820-X
- Laplante, P., Diorio, J. & Meaney, M.J., 2002. Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT<sub>7</sub> receptor. *Developmental Brain Research*, 139, pp.199–203.
- Leonardo, E.D. & Hen, R., 2008. Anxiety as a Developmental Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 33, pp.134–140.
- Lesage, J. et al., 2007. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292, pp.1526–1533.

- Lesage, J. et al., 2002. Perinatal malnutrition programs sympathoadrenal and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress in adult male rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 14, pp.135–143.
- Liu, D. et al., 2000. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 12, pp.5–12.
- Liu, D. et al., 2010. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277, pp.1659–1662.
- Luo, Y., Cao, Z. & Wang, D., 2014. Dynamic study of the hippocampal volume by structural MRI in a rat model of depression. *Journal of Neurological Sciences*, 35, pp.1777–1783.
- Lytinas, M. et al., 2003. Acute stress results in skin corticotropin-releasing hormone secretion, mast cell activation and vascular permeability, an effect mimicked by intradermal corticotropin-releasing hormone and inhibited by histamine-1 receptor antagonists. *International Archives of Allergy and Immunology*, 130, pp.224–231.
- McEwen, B.S., 2005. Stressed or stressed out: what is the difference? *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 30, pp.315–318.
- McNally, G.P. & Akil, H., 2002. Role of corticotropin-releasing hormone in the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in the behavioral, pain modulatory, and endocrine consequences of opiate withdrawal. *Neuroscience*, 112, pp.605–617.
- Meaney, M.J. et al., 1984. Early Postnatal Handling Alters Glucocorticoid Receptor Concentrations in Selected Brain Regions. *Behavioral Neuroscience*, 127, pp.637–641.
- Miller, G.E. et al., 2009. Low early-life social class leaves a biological residue manifested by decreased glucocorticoid and increased proinflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, pp.14716–14721.
- Murgatroyd, C. et al., 2009. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature Neuroscience*, 12, pp.1559–1565.
- Murgatroyd, C. et al., 2015. Effects of prenatal and postnatal depression, and maternal stroking, at the glucocorticoid receptor gene. *Translational Psychiatry*, 5, p.e560.
- Murphy, V.E. et al., 2002. Reduced 11- $\beta$ hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity is associated with decreased birth weight centile in pregnancies complicated by asthma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87, pp.1660–1668.
- Nakamura, K. et al., 2016. Effects of vasopressin V1b receptor deficiency on adrenocorticotropin release from anterior pituitary cells in response to oxytocin stimulation. *Endocrinology*, 149, pp.4883–4891.
- Nautiyal, K.M. et al., 2008. Brain mast cells link the immune system to anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, pp.18053–18057.
- Nephew, B.C. & Bridges, R.S., 2012. Effects of chronic social stress during lactation on maternal behavior and growth in rats. *Stress*, 14, pp.677–684.
- Nicholls, J.G. et al., 2001. *Od neuronu k mozku* 4th ed., Academia, 316-317, ISBN: 978-80-200-2155-7
- Notake, M. et al., 1983. Isolation and characterization of the mouse corticotropin- $\beta$ -lipotropin precursor gene and a related pseudogene. *FEBS Letters*, 156, pp.67–71.
- Opal, S.M. & DePalo, V.A., 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Tomorrow's medicine*, 117, pp.1162–1172.
- Oreland, S. et al., 2009. Two repeated maternal separation procedures differentially affect brain 5-

- hydroxytryptamine transporter and receptors in young and adult male and female rats. *Brain Research*, 1305, pp.S37–S49.
- Pascuan, C.G. et al., 2014. Prenatal stress induces up-regulation of glucocorticoid receptors on lymphoid cells modifying the T-cell response after acute stress exposure in the adult life. *Physiology & Behavior*, 128, pp.141–147.
- Ralainirina, N. et al., 2010. Mouse natural killer (NK) cells express the nerve growth factor receptor TrkA, which is dynamically regulated. *PloS ONE*, 5, p.e15053.
- Refojo, D. et al., 2011. Glutamatergic and dopaminergic neurons mediate anxiogenic and anxiolytic effects of CRHR1. *Science*, 333, pp.1903–1908.
- Rice, D. & Barone, S.J., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models birth. *Environmental Health Perspectives*, 108, pp.511–533.
- Rivier, J. & Spiess, J., 1983. Characterization of rat hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, pp.4851–4855.
- Roberts, J.L. et al., 1979. Corticotropin and beta-endorphin: Construction. *Biochemistry*, 76, pp.2153–2157.
- Savignac, H.M., Dinan, T.G. & Cryan, J.F., 2011. Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, pp.1–12.
- Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138, pp.32–32.
- Shepard, J.D., Barron, K.W. & Myers, D.A., 2000. Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain Research*, 861, pp.288–295.
- Shepard, J.D. & Myers, D.A., 2008. Strain differences in anxiety-like behavior : Association with corticotropin-releasing factor. *Behavioural Brain Research*, 186, pp.239–245.
- Shipton, O.A. et al., 2014. Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, pp.15238–15243.
- Simen, B.B. et al., 2006. Signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. *Biological Psychiatry*, 59, pp.775–785.
- Smith, S.M. & Vale, W.W., 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8, pp.383–395.
- Steimer, T., 2002. The biology of fear and anxiety-related behaviors. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 4, pp.231–249.
- Stinnett, G.S., Westphal, N.J. & Seasholtz, A.F., 2015. Pituitary CRH-binding protein and stress in female mice. *Physiology & Behavior*, 150, pp.16–23.
- Theoharides, C.T. et al., 1996. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. *Endocrinology*, 136, pp.5745–5750.
- Tomlinson, J.W. et al., 2001. Regulation of expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology*, 142, pp.1982–1989.
- Tomlinson, J.W. et al., 2004. Specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine Reviews*, 25, pp.831–866.
- Ulrich-Lai, Y.M. & Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, pp.397–409.
- Vanbesien-Mailliot, C.C.A. et al., 2007. Prenatal stress has pro-inflammatory consequences on the immune system in adult rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32, pp.114–124.



- Veenema, A.H., Bredewold, R. & Neumann, I.D., 2007. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 32, pp.437–450.
- Veru, F. et al., 2014. Prenatal maternal stress exposure and immune function in the offspring. *Stress*, 17, pp.133–148.
- Vodička, M. et al., 2014. Regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 7 $\alpha$ -hydroxylase CYP7B1 during social stress. *PloS ONE*, 9, p.e89421.
- Wang, X. et al., 2012. Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1. *European Journal of Neuroscience*, 36, pp.2360–2367.
- Xu, L., Sun, Y. & Gao, L., 2014. Prenatal restraint stress is associated with demethylation of corticotrophin releasing hormone (CRH) promoter and enhances CRH transcriptional responses to stress in adolescent rats. *Neurochemical Research*, 39, pp.1193–1198.
- Zagron, G. & Weinstock, M., 2006. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 175, pp.323–328.
- Zhang, J.-M. & An, J., 2009. Cytokines, inflammation and pain. *International Anesthesiology Clinics Journal*, 45, pp.27–37.
- Zhang, T.Y. et al., 2005. The expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *The Journal of Immunology*, 174, pp.879–889.
- Zhou, H., Cooper, M.S. & Seibel, M.J., 2013. Endogenous glucocorticoids and bone. *Bone Research*, 2, pp.107–119.
- Zhu, L. et al., 2014. The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. *PLoS ONE*, 9, p.e97689.
- Zohar, I. & Weinstock, M., 2011. Differential effect of prenatal stress on the expression of corticotrophin-releasing hormone and its receptors in the hypothalamus and amygdala in male and female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, pp.320–328.
- Zuena, A.R. et al., 2008. Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PloS ONE*, 3, p.e2170.
- <http://www.who.int/suggestions/faq/en/>